

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Obtention d'un anticorps contre un épitope rhamnogalacturonane I par phage display

VERHERTBRUGGEN, Yves

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**OBTENTION D'UN ANTICORPS CONTRE UN EPITOPE
RHAMNOGALACTURONANE I PAR PHAGE DISPLAY**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Yves Verherlbruggen

Septembre 2004

Production d'une sonde recombinante par phage display contre un épitope de rhamnogalacturonane I

VERHERTBRUGGEN Yves

Résumé

Le rhamnogalacturonane I (RGI) est une molécule pectique complexe de la paroi cellulaire végétale dont le squelette est composé d'une alternance d'acides galacturoniques et de rhamnoses, eux-mêmes porteurs de chaînes latérales riches en arabinose et/ou galactose. En plus d'un rôle structural, le RGI intervient dans de nombreux phénomènes liés au développement et à la différenciation des cellules. Si, durant ces dernières années, les anticorps se sont révélés être d'excellents outils pour investiguer le rôle des polysaccharides pariétaux, ils restent toutefois difficiles à obtenir et leur nombre est actuellement limité à une dizaine. Dans ce mémoire, nous avons entrepris d'isoler un anticorps recombinant anti-RGI par phage display, au départ d'une banque synthétique (Griffin 1, Medical Research Council, Cambridge). Nous avons réalisé quatre procédures de sélection d'affinité (ou panning) différentes pour lesquelles nous avons modifié, au cours des cycles, les protéines de saturation (caséine, BSA, poudre de lait, protéines de phages M13) de manière à limiter la fixation non spécifique de phages recombinants. Des tests ELISA de phages polyclonaux et des analyses PCR des inserts présents dans les clones des banques secondaires ont été effectués en parallèle afin de vérifier le fonctionnement des pannings. Aucune des procédures testées n'a conduit à un enrichissement spécifique et significatif des populations de phages recombinants anti-RGI au cours des cycles de sélection. Nous avons néanmoins, par ELISA monoclonal, isolé un clone phage-anticorps « F2 » se liant spécifiquement au RGI et porteur d'un insert scFv complet.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2004

Promoteur: P. Van Cutsem

Merci au professeur Van Cutsem et au chef d'unité de l'URBV, Mr Messiaen, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Merci à toute l'équipe du laboratoire.

Merci aux membres du jury.

Un grand merci à ma tutrice, Françoise Liners ainsi qu'à Françoise Lonnoy.

De même, un grand merci à Aurore, Djoule et Circle Pit.

Je tiens également à remercier tous les phages ayant participé aux expériences que j'ai menées, vous avez été des millions de bénévoles à me soutenir dans mon action, cela fait chaud au cœur. De même, il me semble opportun d'émettre ici une pensée toute particulière aux *Escherichia coli* qui ont fait don de leur corps à la science ; sans vous, rien n'aurait été possible.

Kathleen, ce paragraphe est court mais il est pour toi.

M'an, de même !

Enfin pour terminer, je voudrais remercier l'inventeur de la page de remerciement, sans qui cette page n'aurait pas non plus pu être réalisée.

A tous ceux que je n'ai pas eu le temps de citer auparavant : merci. Vous savez qui vous êtes.

Ac : anticorps

BSA : albumine de sérum bovin

Caséine : hydrolysate de caséine

CDR : complementary determining region

EP M13 : extrait protéique de phages M13

Fab : fragment antibody binding

HG : homogalacturonane

MCP : pectine modifiée de citron

PdL : poudre de lait

RGI : rhamnogalacturonane I

RGII : rhamnogalacturonane II

scFv : single chain fragment variable

INTRODUCTION.....	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	8
I. LA PAROI VÉGÉTALE	10
I.1. Les polysaccharides pariétaux.....	10
I.1.1 La cellulose.....	10
I.1.2 Les hémicelluloses.....	11
I.1.3 Les pectines	12
I.1.3.1 Le rhamnogalacturonane I.....	14
I.1.3.2 Le rhamnogalacturonane II	16
I.2. Modèles organisationnels des parois.....	15
I.3 Propriétés des rhamnogalacturonanes I	18
I.3.1 Le rhamnogalacturonane I et les propriétés mécaniques de la paroi.....	18
I.3.2 Le rhamnogalacturonane I et la division cellulaire	18
I.3.3 Le rhamnogalacturonane I et la différenciation cellulaire	19
I.3.4 Activité biologique du rhamnogalacturonane I.....	19
II. LE PHAGE DISPLAY	21
II.1 Les phages	21
II.1.1 Généralités.....	21
II.1.2 Le phage M13.....	22
II.1.3 Les protéines PIII et PVIII	23
II.1.4 L'obtention de phages hétérogènes	24
II.2 Les banques.....	26
II.2.1 Les banques d'anticorps	26
II.2.2 Construction d'une banque de scFv.....	26
II.2.3 La sélection	29
II.3 Avantages et inconvénients du phage display.....	30
II.3.1 Intérêts du phage display	30
II.3.2 Limites du phage display	30
III. OBTENTION D'ANTICORPS ANTI-POLYSACCHARIDES PAR PHAGE DISPLAY	32
IV. OBJECTIF DU MÉMOIRE	32
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
1. Estimation du titre d'un stock de phage M13	35
1.1. Matériel	35
1.2. Protocole	35
2. Constitution d'un stock de phage M13	35
2.1. Matériel	35
2.2. Protocole	35
3. Sélection des phages ou « panning »	36
3.1 Matériel	36
3.2 Protocole	36
4. ELISA de phages polyclonaux.....	39
4.1 Matériel	39
4.2 Protocole	39
5. ELISA monoclonal	40
5.1 Matériel	40
5.2. Protocole	40
6. Analyse des clones de la banque : PCR sur colonies	41
6.1. Matériel	41
6.2. Protocole	41
7. Extraction des protéines du phage M13.....	41
7.1. Matériel	41
7.2. Protocole	42
8. Dosage des protéines extraites des phages M13	42
8.1 Matériel	42
8.2. Protocole	42
9. Test de viabilité des phages dilués dans l'extrait protéique du phage M13 en fonction de la concentration et effet de la saturation sur la sélection des phages	43
9.1. Matériel	43

9.2. Protocole	44
10. Milieux et solutions stocks	44
Milieux.....	44
Stocks.....	45
RÉSULTATS.....	46
III. RÉSULTATS	47
III.A. PROCÉDURES UTILISÉES	48
III B. RÉALISATION DU PANNING A	48
III.b.1 La sélection d'affinité (alternance caséine, BSA, PdL, caséine).....	48
III.b.2 ELISA de phages polyclonaux	50
III.b.3 Analyse des clones des banques I, II et III du panning A par PCR sur colonies.....	52
III.b.4 Conclusion	55
III.C. RÉALISATION DU PANNING B	56
III.c.1 La sélection d'affinité (alternance caséine et PdL).....	56
III.c.2 ELISA de phages polyclonaux	56
III.c.3 Analyse des clones des banques II et III du panning B par PCR sur colonies.....	60
III.c.4 Conclusion.....	60
III.D. RÉALISATION DU PANNING C	62
III.d.1 La sélection d'affinité (soustraction des phages non spécifiques).....	62
III.d.2 ELISA de phages polyclonaux	63
III.d.3 Analyse des clones des banques I et II du panning C par PCR sur colonies.....	63
III.d.4. Conclusions.....	65
III.E. RÉALISATION DU PANNING D	66
III.e.1 Préparation de protéines de phages M13.....	66
III.e.2 Test de viabilité des phages dilués dans l'EP M13 et effet de la saturation en EP M13 sur la sélection des phages	66
III.e.3 La sélection d'affinité (EP M13 0,14 mg/ml et 0,07 mg/ml)	68
III.e.4 Analyse des clones des banques I, II et III des panning Da et Db par PCR sur colonies	70
III.e.5. Conclusions	71
III.F. ELISA DE PHAGES POLYCLONAUX AVEC UNE SATURATION AU SÉRUM DE VEAU	73
III.G. ISOLEMENT DE PHAGES MONOCLONAUX ANTI-RGI	74
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	80

Introduction

Introduction générale

La paroi cellulaire végétale assure au protoplaste une résistance à la pression de turgescence et joue un rôle fondamental dans le contrôle de la croissance et de la morphogénèse ainsi que dans la résistance du végétal aux pathogènes (Ridley *et al.*, 2001). Les composants de la paroi qui interviennent dans ces trois derniers phénomènes sont essentiellement des fragments de pectine nommés oligosaccharines (Côté *et al.*, 1994). Il reste encore un grand nombre de mécanismes à élucider pour comprendre comment ces oligosaccharides agissent. De même, la biogénèse de la paroi cellulaire végétale est très peu comprise. Durant ces dix dernières années, les anticorps dirigés contre des polysaccharides végétaux se sont avérés être des outils précieux pour circonscrire les rôles de la paroi cellulaire végétale. Ils ont ainsi démontré que des composés pectiques intervenaient dans le développement cellulaire, leur présence et leur composition étant propre à un stade développemental. De même, ils ont mis en évidence des micro-hétérogénéités alors insoupçonnées au sein des parois, telles que l'existence d'une zone de transition entre cellules indifférenciées et cellules différenciées dans les apex racinaires (Bush *et al.*, 2001 ; McCartney *et al.*, 2003).

Actuellement, il n'existe qu'une dizaine d'anticorps contre les constituants polysaccharidiques de la paroi (tableau 1) dont le 2F4, un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope conformationnel de la pectine, produit dans notre laboratoire (Liners *et al.*, 1989). Les anticorps (Ac) anti-polysaccharides disponibles sont soit des polysérums, soit des anticorps monoclonaux (Tijssen, 1988). L'antisérum présente l'avantage de pouvoir être produit de manière simple et rapide. Cependant ce mélange d'anticorps, reconnaissant différents épitopes d'un même antigène, n'est pas exactement reproductible d'un animal à l'autre ce qui limite l'approvisionnement en un sérum donné à la durée de vie de l'animal qui le produit. Cet inconvénient est contourné dans le cas de la technique des hybridomes qui aboutit à l'obtention de clones producteurs d'Ac monoclonaux. Un anticorps issu d'un hybridome, cellule résultant de la fusion d'un lymphocyte B et d'une cellule de myélome, présente l'avantage de reconnaître son épitope avec une affinité et une spécificité fixées (De jaeger *et al.*, 1996). De plus, son approvisionnement est illimité (Tijssen, 1988). Il n'est cependant pas toujours possible d'obtenir via cette méthode, des anticorps contre des molécules faiblement immunogènes, comme c'est le cas des polysaccharides qui composent la paroi végétale (MacKenzie et To, 1998). Une méthode alternative consiste à obtenir des anticorps spécifiques à l'aide de la technique du phage display. Cette approche présente l'avantage, par rapport à la technique de l'hybridome, de permettre l'obtention plus facile d'anticorps contre ce type de molécule. Pour preuve, les anticorps CCRC-R1 et PAM1 (Williams *et al.*, 1996 ; Willats *et al.*, 1999a), tous deux dirigés contre des composés pectiques de la paroi, ont été obtenus via cette méthode. Appliquée dans notre laboratoire, elle a permis l'obtention d'anticorps recombinants contre des carraghénanes, des polysaccharides sulfatés présents dans la paroi d'algues rouges (Rhodophycées) (Liners et Van Cutsem, soumis) et des alginates (non publié).

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons tenté d'obtenir, par la technique du phage display, un anticorps spécifique du rhamnogalacturonane I (RGI), un des constituants des pectines. L'obtention d'un tel Ac constituerait un outil permettant d'éclairer un peu plus nos connaissances sur le fonctionnement de la paroi végétale et sur les polymères pectiques qui la composent.

Avant de détailler la technique phage display, nous commencerons d'abord par introduire quelques notions concernant l'antigène cible de ce travail, le rhamnogalacturonan I.

Tableau I.1 liste des anticorps publiés reconnaissant des composés polysaccharidiques de la paroi cellulaire végétale.

<i>anticorps</i>	<i>Type d'anticorps</i>	<i>Antigène/épitope</i>	<i>Références</i>
	m	Callose/(1→3)-β-D-glucane	Meikle <i>et al.</i> , 1991
BG1	m	(1→3) (1→4)-β-D-glucane	Meikle <i>et al.</i> , 1994
BGMC6	m	Galactomannane/(1→4)-β-D-mannane	Pettolino <i>et al.</i> , 2001
CCRC-M1	m	Xyloglucane/t-a-fucose-(1→2)-lié au D-galactosyl	Puhlmann <i>et al.</i> , 1994
JIM5	r	HG/faiblement ou peu méthyl-esterifiés	VandenBosch <i>et al.</i> , 1989 ; Knox <i>et al.</i> , 1990 ; Willats <i>et al.</i> , 2000a
JIM7	r	HG/méthyl-esterifié	Knox <i>et al.</i> , 1990 ; Willats <i>et al.</i> , 2000a
2F4	m	HG/non esterifié et dimérisé via des ions calciques	Liniers <i>et al.</i> , 1989, 1992
PAM1	s	HG/ non esterifié	Willats <i>et al.</i> , 1999a, 2000a
LM7	r	HG/désesterifié aléatoirement	Willats <i>et al.</i> , 2001a
	as	RGII dimérique	Matoh <i>et al.</i> , 1998
CCRC-R1	s	RGII monomérique	Williams <i>et al.</i> , 1996
CCRC-M2	m	RGI/ inconnu	Pulhmann <i>et al.</i> , 1994
CCRC-M7	m	RGI/(1→6)-β-galactane auquel sont fixés des arabinoses	Pulhmann <i>et al.</i> , 1994 ; Steffan <i>et al.</i> , 1995
LM5	r	RGI/(1→4)-β-D-galactane	Jones <i>et al.</i> , 1997 ; Willats <i>et al.</i> , 1999a
LM6	r	RGI/(1→5)-α-L-arabinane	Willats <i>et al.</i> , 1998, 1999a
	as	(1→3,6)-β-D-galactosyl “uronosylé”	Andème-Onzighi <i>et al.</i> , 2000
LM8	m	xylogalacturonane	Willats <i>et al.</i> , 2004

m = anticorps monoclonal de souris ; r = anticorps monoclonal de rat ; s = anticorps (recombinant) synthétique ; as = antisérum de lapin

HG = homogalacturonane, RGI = rhamnogalacturonane-I, RGII = rhamnogalacturonane-II (Willats, 2003 et Willats *et al.*, 2004)

I. La paroi végétale

Cette structure semi-rigide qui entoure la cellule se compose typiquement de trois couches : la lamelle mitoyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 1) (Raven *et al.*, 2000). La lamelle mitoyenne, formée par le phragmoplaste en fin de division cellulaire, est coincée entre les parois primaires des deux cellules filles résultant de cette division. A la paroi primaire peut s'ajouter sur sa face interne et lorsque la croissance cellulaire s'achève, une paroi secondaire (Figure 1) (Reiter, 2002). La paroi détermine en grande partie la taille et la forme de la cellule, la texture du tissu et la forme finale de l'organe de la plante (Willats *et al.*, 2001b). Ses caractéristiques physico-chimiques (telles que épaisseur, taux de lignification, teneur en eau ou encore composition chimique) varient d'une espèce à l'autre, d'un tissu à l'autre et même d'une cellule à l'autre. Dans un tissu vivant, l'eau peut représenter jusqu'à 70% du volume de la paroi primaire (Cosgrove, 1997). De manière générale, la paroi est composée de glycoprotéines (2 à 10% du poids sec), de composés phénoliques (<2% du poids sec), de minéraux (1 à 5%) et majoritairement de polysaccharides (90%) regroupés en 3 classes : cellulose, hémicelluloses et pectines (Oomen *et al.*, 2002).

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons décrire plus précisément ces polysaccharides en attachant une attention plus particulière à la pectine.

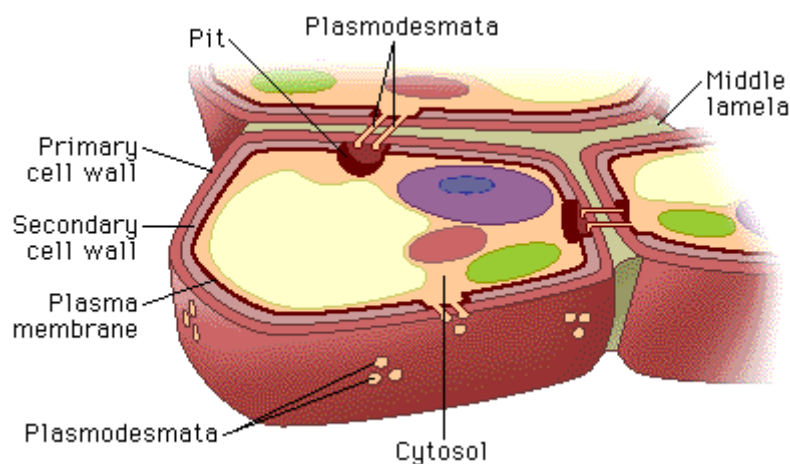


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule végétale et de sa paroi
www.ualr.edu/~botany/plantcells.html.

I.1. Les polysaccharides pariétaux

I.1.1 La cellulose

Principal constituant des parois cellulaires végétales secondaires, cet homopolymère formé d'une chaîne linéaire de β -1,4-D-glucose présente un aspect de ruban plat (Cosgrove, 1997). L'assemblage de ces chaînes grâce à des ponts hydrogènes donne lieu à la formation de microfibrilles qui à leur tour s'enroulent entre elles pour former des macrofibrilles dont le diamètre mesure environ 0,5 μm (Figure 2) (Raven *et al.*, 2000).

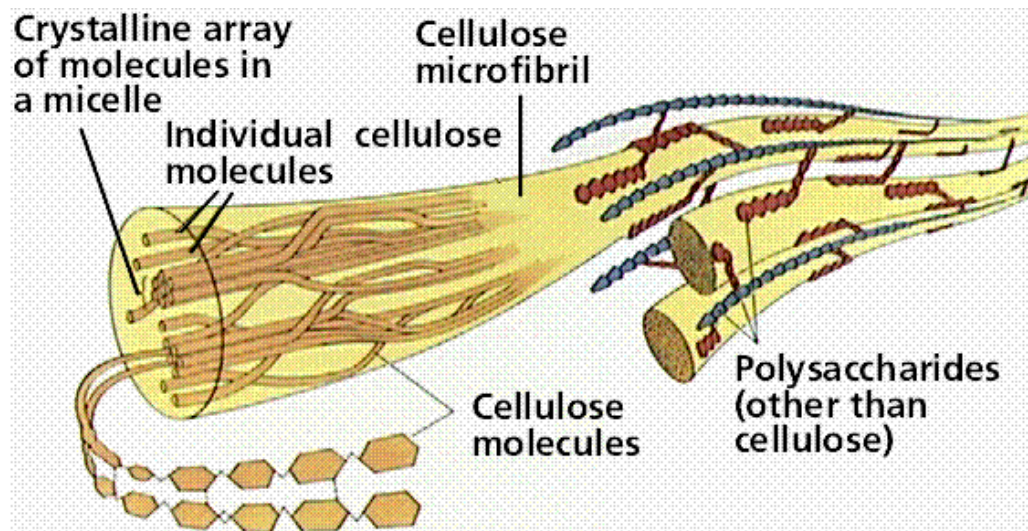


Figure 2 : Représentation schématique de la structure des microfibrilles de cellulose et l'agencement des fibres dans la paroi végétale.

1.1.2 Les hémicelluloses

Cette catégorie de polysaccharides comprend les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes et les arabinoxylanes. La similarité structurale entre hémicelluloses et cellulose mène à une forte association non covalente de l'hémicellulose avec les microfibrilles de cellulose (O'Neill et York, 2003).

Excepté chez les graminées, les xyloglucanes représentent les polysaccharides hémicellulosiques les plus abondants (jusqu'à 20% du poids sec) dans la paroi cellulaire primaire des plantes supérieures (O'Neill et York, 2003). Ils sont constitués d'un squelette composé de résidus β -1,4-D-glucose auxquels sont greffés de courtes chaînes latérales contenant du xylose, du galactose et se terminant fréquemment par un fucose (Figure 3) (Reiter, 2002). Les xylanes sont des polymères de résidus β -1,4-D-xylose présentant des arabinofuranoses ainsi que des acides glucuroniques (Willats *et al.*, 2001b).

Les mannanes et galactomannanes sont des polymères de β -1,4-D-mannose localisés essentiellement dans les graines des légumineuses. Les galactomannanes possèdent, greffées sur leur squelette de résidus mannoses, des chaînes ramifiées contenant des galactoses. Les glucomannanes, abondants dans la paroi secondaire des cellules d'espèces ligneuses, ont un squelette composé de résidus β -1,4-D-mannose et β -1,4-D-glucose disposés en alternance (Figure 4) (O'Neill et York, 2003).

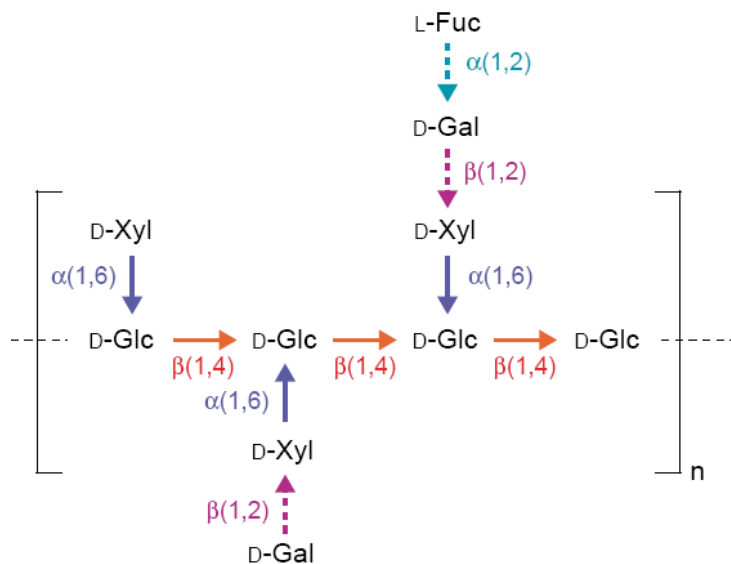
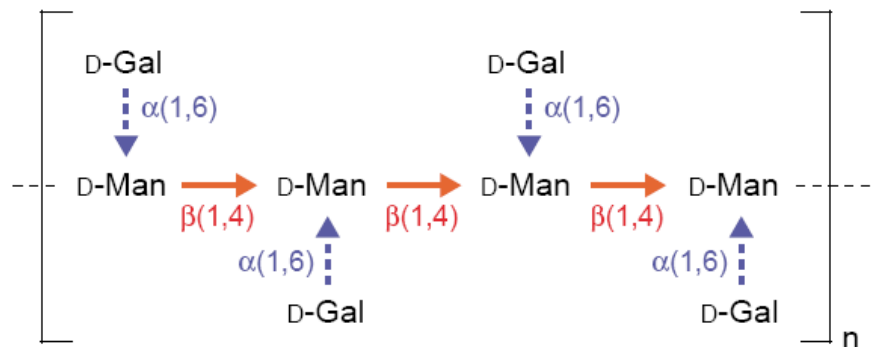


Figure 3 : Structure du xyloglucane. Les flèches pleines indiquent des liens qui sont toujours présents, alors que les flèches en pointillés indiquent des modes de substitution partielle. Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Xyl : xylose (Reiter, 2001).

Figure 4 : Structure du galactomannane. Les flèches pleines indiquent des liens qui sont toujours présents, alors que les flèches en pointillés indiquent des modes de substitution partielle. Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; Man : mannose (Reiter, 2001).



I.1.3 Les pectines

Il s'agit d'un des constituants majeurs de la paroi primaire des dicotylées. Les pectines sont principalement formées d'acides α -D-galacturoniques auxquels s'ajoutent également des rhamnoses, des arabinoses et des galactoses. Bien que présents dans des quantités différentes, 12 résidus glycosyl différents ont été identifiés comme constituants des pectines de la paroi primaire (Figure 5) (Mohnen, 1999). Sur base de ses propriétés physico-chimiques, on distingue au sein d'une molécule pectique des régions lisses et des régions hérissées (Vincken *et al.*, 2003a). Les régions lisses, ou homogalacturonanes (HG), sont un assemblage d'acides α -D-galacturoniques liés en α -1,4 dépourvus de chaînes latérales, partiellement méthyl-esterifiés sur le carbone 6 et en partie acétylés sur les carbones 2 ou 3 (Figure 6) (Willats *et al.*, 2001b). Le degré de polymérisation de l'homogalacturonane reste un sujet de débat. Actuellement, on estime qu'il est compris entre 30 et 200 résidus (Mohnen, 1999). Les régions hérissées, elles, sont constituées des rhamnogalacturonanes I et II (Figure 6).

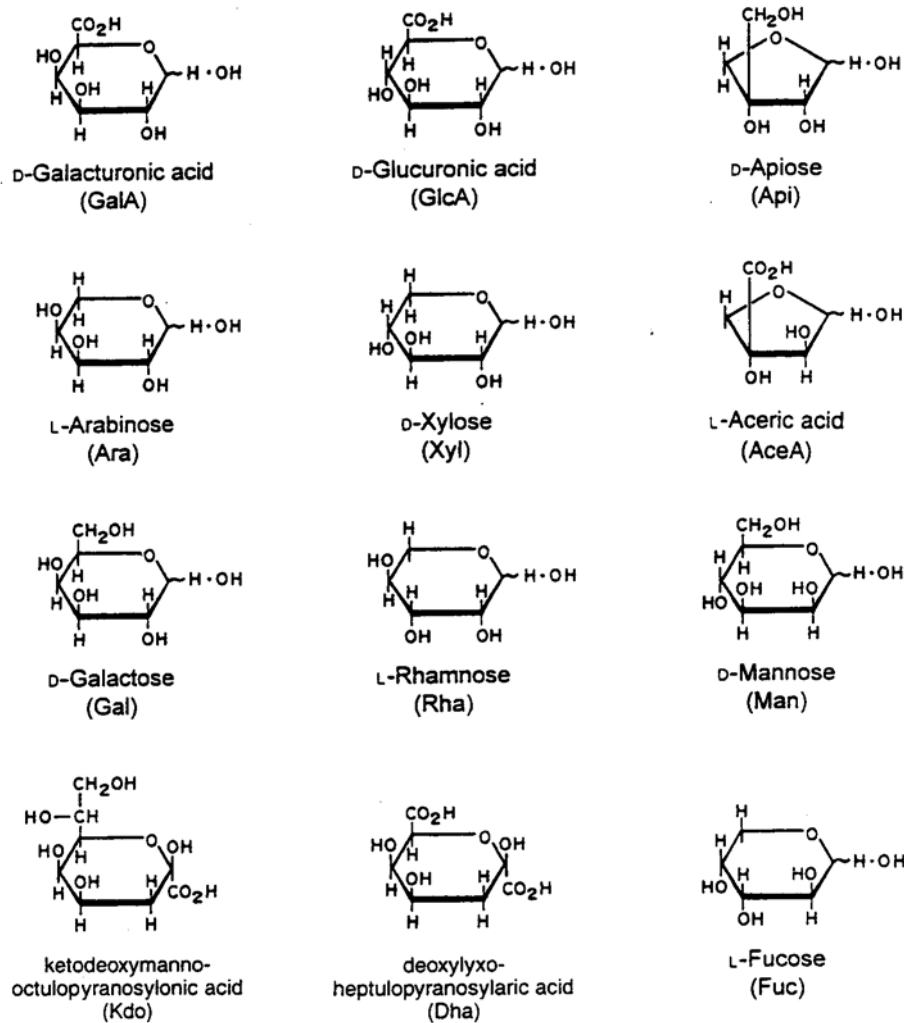


Figure 5 : Projections d'Haworth des 12 sucres présents dans la pectine (Mohnen, 1999).

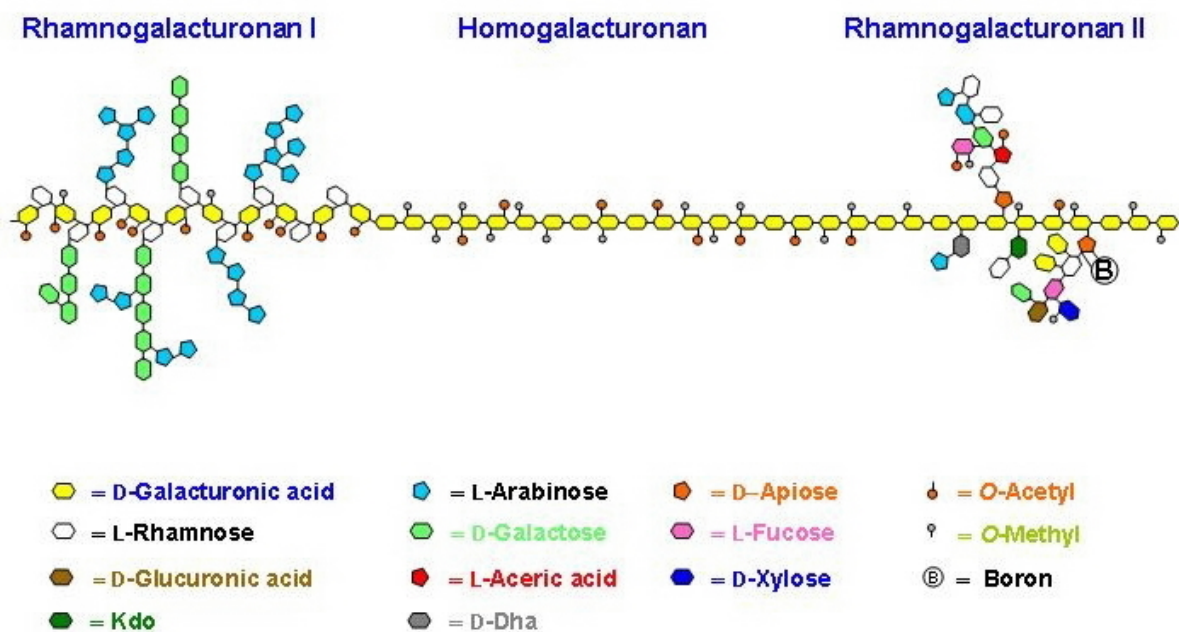


Figure 6 : Représentation schématique de la pectine.

1.1.3.1 Le rhamnogalacturonane I

Le squelette du rhamnogalacturonane I (RGI) est composé d'environ 100 répétitions d'un disaccharide formé d'acide α -D-galacturonique et d' α -L-rhamnose (Vincken *et al.*, 2003b). De 20 à 80% des rhamnoses présents dans la région hérissée possèdent des chaînes latérales de 1 à 50 résidus fixées au niveau de leur carbone 4 ou occasionnellement de leur carbone 3 (Mohnen, 1999). Ces chaînes latérales linéaires ou ramifiées sont constituées d'arabinose (arabinane), de galactose (galactane) et d'un mélange d'arabinose et de galactose (arabinogalactane) ou AGI (Bush *et al.*, 2001).

L'AGI est composé d'un squelette de β -D-galactane liés en 1,4 (Schols et Voragen, 2002) auquel peuvent se brancher par substitution du carbone 3 de courtes chaînes de (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinofuranosyl (Figure 7) (Mohnen, 1999). L'arabinofuranosyl est la forme sous laquelle se trouve l'arabinose dans la pectine. Il existe d'autres types d'arabinogalactanes, nommés arabinogalactanes II (AGII), localisés principalement sur des protéines (AGP ou arabinogalactane protéines). Cependant, il plane toujours un doute quant à l'appartenance des AGII au complexe pectique. AGI et AGII sont souvent co-extraits et il est difficile de les séparer l'un de l'autre par la suite, ce qui peut laisser penser que ces deux composants sont liés de manière covalente (Vincken *et al.*, 2003a). L'AGII est composé d'un squelette de β -D-galactoses liés en 1,3 auxquels sont attachés de courtes chaînes latérales d'(1 \rightarrow 6)- α -L-arabinofuranosyl-[(1 \rightarrow 6)- β -D-galactosyl]_n, où n = 1, 2 ou 3 (Ridley *et al.*, 2001). Les résidus galactosyl des chaînes latérales peuvent être substitués par des résidus (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinofuranosyl.

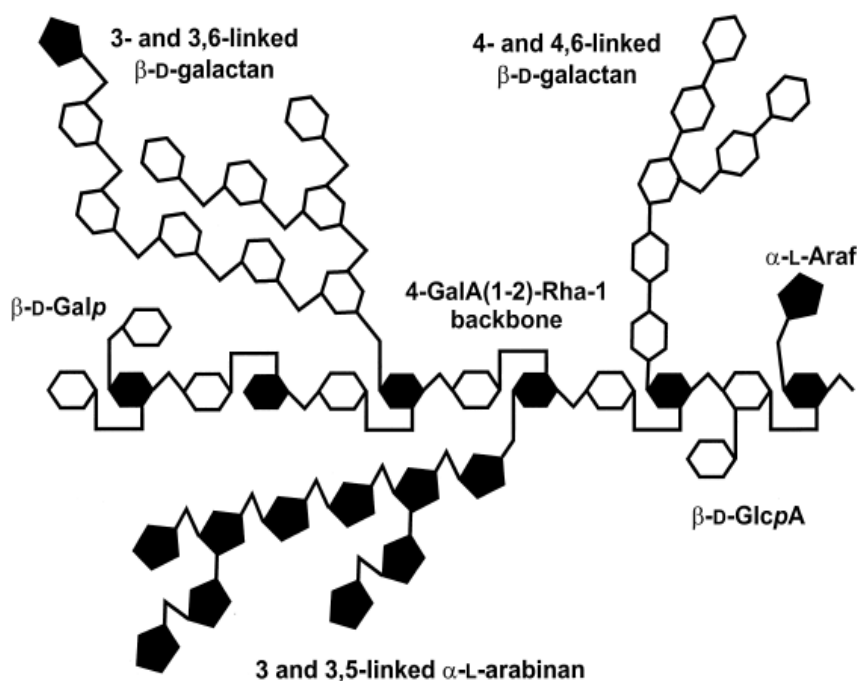


Figure 7 : Modèle présentant les principales caractéristiques du RGI. Le squelette est composé d'une centaine de répétitions d'un disaccharide formé d'acide α -D-galacturonique et d' α -L-rhamnose. Les chaînes latérales linéaires ou ramifiées, liées au carbone 4 des résidus rhamnose, sont composées d'arabinose et/ou de galactose. Des résidus rhamnose peuvent être O-acétylés sur leur carbone 2 et/ou 3 (Ridley *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Le rhamnogalacturonane II

Contrairement à ce que suggère son nom, le rhamnogalacturonane II (RGII) est structurellement très différent du RGI. En effet, son squelette n'est pas composé d'une alternance d'acide α -D-galacturonique et d' α -L-rhamnose mais plutôt de 9 résidus acides α -D-galacturoniques auxquels peuvent se fixer quatre différentes chaînes latérales formées d'arabinoses, de galactoses et de 9 autres résidus glycosidiques rares tels le 2-O méthylfucose, le 2-O méthylxylose, l'apiose, le Dha (acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulopyranosylarique) ou encore le KDO (acide 2-keto-3-déoxy-manno-octulopyranosylonique) (Ridley *et al.*, 2001 ; Iwai *et al.*, 2002). La structure exacte du RGII, en particulier la distribution des quatre chaînes latérales, n'a toujours pas été élucidée (Vincken *et al.*, 2003a). Toutefois, il semblerait qu'elle soit fortement conservée dans le règne végétal.

I.2. Modèles organisationnels des parois

Les relations existant entre les différents polysaccharides de la paroi sont très complexes. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la structure de la paroi. Le premier fut celui d'Albersheim en 1973 qui reposait sur les liens covalents entre les pectines et le xyloglucane (Keegstra *et al.*, 1973). Cependant, aucun fragment d'oligosaccharide contenant à la fois des portions de pectines et de xyloglucanes n'a été isolé et caractérisé du point de vue structurel.

Les modèles plus récents, tel que celui de Carpita et Gibeaut (Figure 8), mettent l'accent sur les interactions non covalentes entre les polymères de la paroi et stipulent la présence de deux principaux réseaux indépendants mais interagissant ensemble (Figure 9) : le premier réseau est composé des polysaccharides pectiques (HG, RGI et RGII), le second est constitué de cellulose et de xyloglucane (Carpita et Gibeaut, 1993). Un réseau supplémentaire composé de glycoprotéines peut être également présent dans la paroi. Le réseau cellulose/xyloglucane serait la principale structure jouant le rôle d'armature de la paroi cellulaire. La fonction d'armature est moins fréquemment attribuée au réseau pectique qui aurait plutôt une fonction de remplissage, contrôlant la porosité de la paroi et les liaisons électrostatiques de molécules chargées positivement, telles que des enzymes. Ce réseau pectique pourrait donc compartimenter l'espace apoplastique et ainsi empêcher des enzymes et d'autres macromolécules de diffuser dans des sites inappropriés. Selon ce modèle, le réseau pectique pourrait également fonctionner comme un senseur du stress mécanique ou des tensions élastiques dans la paroi cellulaire. Il permettrait donc à la cellule de répondre à ces phénomènes en modulant l'activité des enzymes qui modifient la paroi cellulaire ou en contrôlant la vitesse à laquelle les polysaccharides de la paroi sont synthétisés (O'Neill et York, 2003).

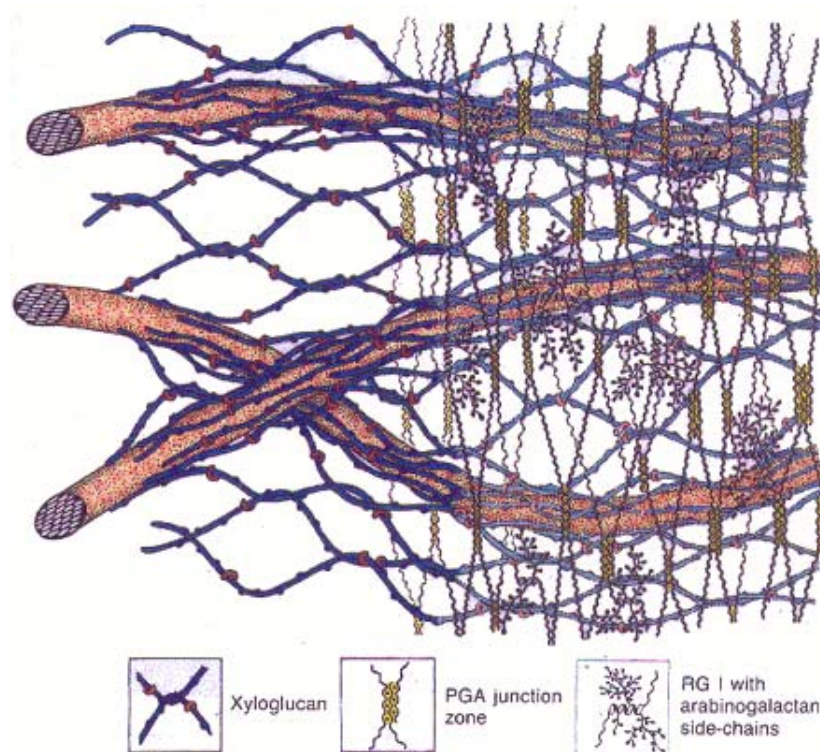


Figure 8 : Modèle de la paroi cellulaire végétale de Carpita et Gibeaut (Carpita et Gibeaut, 1993).

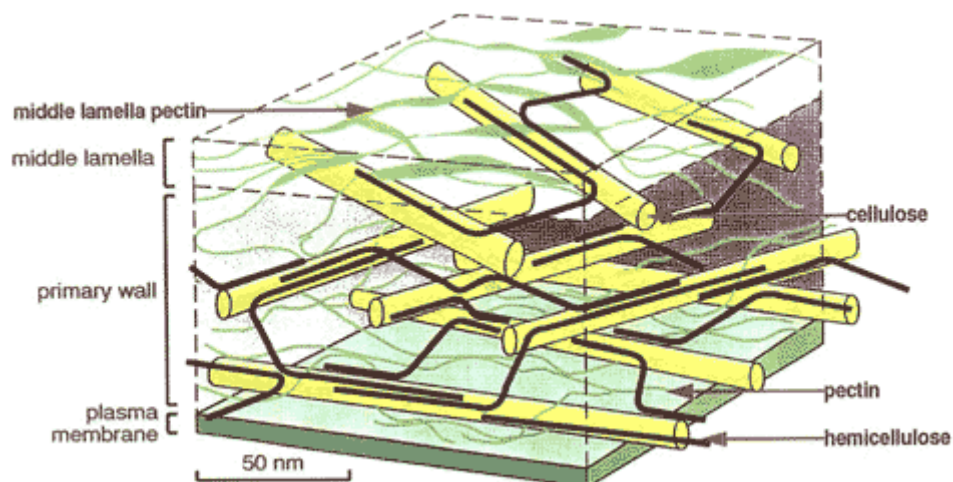


Figure 9 : Modèle de la paroi cellulaire végétale (O'Neill et York, 2003).

Le dernier modèle à avoir été proposé est, à notre connaissance, celui de Vincken et ses collaborateurs. Contrairement aux modèles proposés auparavant qui n'accordaient que peu de considération à la formation de la lamelle mitoyenne ainsi qu'à la présence de microdomaines dans la paroi, leur modèle propose une vision inverse dans laquelle la paroi serait constituée d'un réseau de cellulose/xyloglucane enrobé dans une matrice de pectines interconnectées. Etant donné que l'on ne sait pas encore actuellement quel polysaccharide (pectines, cellulose ou xyloglucanes) est déposé en premier lors de la formation de la plaque

cellulaire, ce modèle est basé sur le postulat que la pectine serait déposée avant la cellulose. La lamelle mitoyenne serait formée suite au dépôt par les deux cellules filles d'HG méthyl-estérifiés qui, après dé-estérification, formeraient un gel de pectate calcique (Figure 10). Après le dépôt de cette première couche de pectine, la synthèse du réseau pectique s'intensifierait pendant que, parallèlement, le réseau de cellulose/xyloglucane prendrait forme. Mais le point innovant dans ce modèle est qu'il considère les chaînes d'HG comme des chaînes latérales de RGI qui, lui, constituerait l'ossature même du réseau pectique. Le RGI parcourerait parallèlement la plaque cellulaire des deux cellules filles et des chaînes d'HG y seraient attachées perpendiculairement. Ces dernières formeraient en divers endroits un gel calcique (Figure 10) et leurs interactions pourraient être renforcées par deux molécules de RGII qui, fixées chacune à un HG différent, formeraient des liaisons intermoléculaires de type borate diester par l'intermédiaire de leur résidus apiosyl (Figure 11) (Vincken *et al.*, 2003a, 2003b).

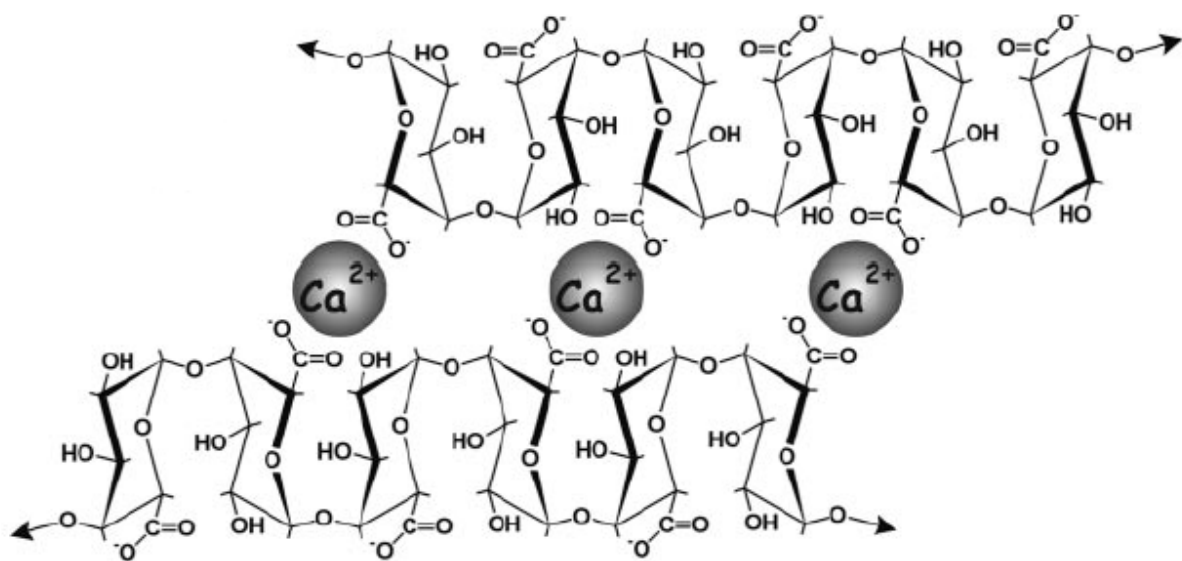


Figure 10 : Interaction par l'intermédiaire d'ions calcium de deux chaînes d'HG non esterifiées. Pour être liées de façon stable et former un « egg-box, » les deux chaînes d'HG doivent avoir un degré de polymérisation de minimum 10 (non représenté sur cette figure) (Vincken *et al.*, 2003b).

Il est bien connu que les pectines, et en particulier les HG, constituent une source de molécules signal (les oligosaccharines, des oligomères de HG dont le degré de polymérisation est au minimum de 9) impliquées dans la différenciation cellulaire, l'organogenèse et la défense du végétal face aux pathogènes (Sorensen *et al.*, 1999 ; Skot *et al.*, 2002). Au cours des dernières années, différents travaux ont révélé que le RGI avait potentiellement un rôle de régulateur dans des phénomènes tels que la différenciation cellulaire. Dans le point suivant, nous allons présenter au travers de ces travaux, les propriétés nouvellement attribuées au rhamnogalacturonane I.

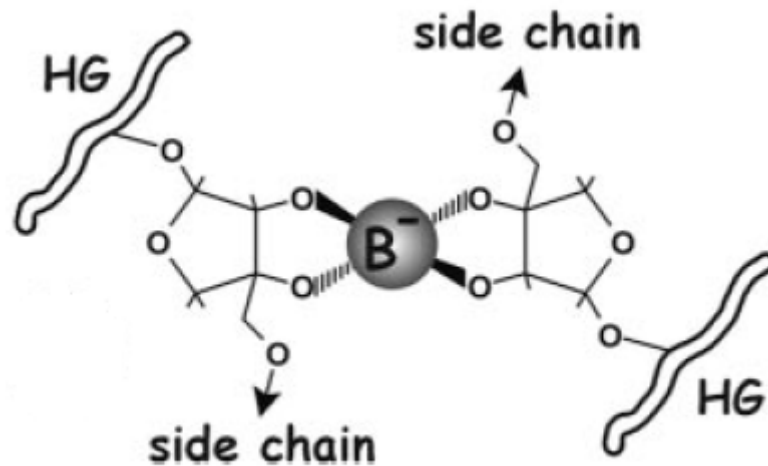


Figure 11 : Lien bore-diols-ester entre deux résidus apioses de deux RGII.
Par l'intermédiaire du RGII, deux HG peuvent se lier ensemble (Vincken *et al.*, 2003b).

I.3 Propriétés des rhamnogalacturonanes I

I.3.1 Le rhamnogalacturonane I et les propriétés mécaniques de la paroi

Le RGI, par l'intermédiaire de ses chaînes latérales d'arabinanes et/ou de galactane, aurait une forte tendance à lier les molécules d'eau. Ce phénomène interférerait avec celui de la formation de zones de jonction par les domaines HG des pectines et modulerait ainsi la porosité des parois (Bush et McCann, 1999 ; Sorensen *et al.*, 1999). Les arabinanes, grâce à leur haute flexibilité, interviendraient fortement dans ce dernier processus (Renard et Jarvis, 1998). Ils jouent en effet un rôle majeur dans le contrôle de la flexibilité des parois des cellules de garde (Jones *et al.*, 2003). En effet, la dégradation des arabinanes de la paroi cellulaire des cellules de garde des stomates empêche l'ouverture ou la fermeture de ces derniers. De plus, une dégradation des homogalacturonanes est capable de lever l'effet dû à la dégradation des arabinanes. Au vu de ces résultats, Jones a émis l'hypothèse que les arabinanes fixés au RGI étaient capables, par encombrement stérique, d'empêcher les domaines HG de se lier les uns aux autres via des ions calcium et de former ainsi une structure rigide. La présence de ces chaînes d'arabinose serait donc essentielle aux parois des cellules de garde pour y maintenir une certaine flexibilité (Jones *et al.*, 2003).

Ces propriétés mécaniques du RGI ont également été invoquées pour expliquer différentes observations liées à la division et à la différenciation cellulaire.

I.3.2 Le rhamnogalacturonane I et la division cellulaire

La surexpression d'une RGI lyase d'*Aspergillus aculeatus* dans le tubercule de pomme de terre, dans le but de dégrader le squelette du RGI *in muro*, conduit à une forte réduction du contenu en galactose et arabinose des tubercules transformés. De plus, les épitopes des Ac LM5 ((1→4)-β-D-galactanes) et LM6 ((1→5)-α-L-arabinane), normalement présents dans la

paroi primaire, sont délocalisés dans les lamelles mitoyennes. Les cellules du périderme des transformants montrent également une organisation anormale des couches cellulaires du fait de divisions s'effectuant selon des plans aléatoires, tandis que ces divisions sont périclines au niveau des individus non transformés. Cette surexpression induit une modification morphologique considérable des tubercules transformés par rapport au phénotype sauvage : leur taille est réduite et leur surface a une apparence froissée, soulignant le rôle crucial du squelette RGI pour l'intégrité des parois (Oomen *et al.*, 2002).

1.3.3 Le rhamnogalacturonane I et la différenciation cellulaire

Des cellules de carotte cultivées en suspension, des tissus provenant de racines de carotte ou encore de tubercules de pomme de terre ont été marqués avec différents anticorps dont le LM5 anti-galactane et le LM6 anti-arabinane, tous deux localisés au niveau du RGI. Ces marquages ont révélé que l'épitope reconnu par le LM5 était fortement présent dans les parois de cellules en suspension en phase de prolifération ou dans la paroi des cellules indifférenciées, localisées au centre du méristème des racines, mais était peu abondant dans les parois de cellules en suspension en phase d'élongation ou dans la paroi des cellules différenciées et plus âgées, situées en périphérie du méristème des racines. A l'opposé, l'épitope du LM6 était plus abondant dans les parois des cellules différenciées que dans celles des cellules indifférenciées. Selon les auteurs de ces études, la localisation spécifique des deux types de chaînes latérales du RGI suggère qu'elles pourraient avoir un rôle distinct dans le développement cellulaire (Willats *et al.*, 1999b ; Bush *et al.*, 2001). Toutefois, aucune fonction précise n'a encore actuellement été attribuée à chacune d'elles.

Remarquons ici que, dans ces études, l'utilisation d'anticorps anti-polysaccharides a joué un rôle primordial. En outre, Bush et McCann signalent que le (1→5)- α -L-arabinane, le polymère linéaire reconnu par l'anticorps LM6, pourrait être, dans certains cas, masqué par d'autres ramifications ou par d'autres modifications ayant lieu au cours du développement de la paroi (Bush et McCann, 1999), soulignant la nécessité d'obtenir d'autres Ac contre le RGI.

Outre son importance dans le végétal, le RGI est par ailleurs doté d'activités biologiques intéressantes.

1.3.4 Activité biologique du rhamnogalacturonane I

Le RGI a la propriété de stimuler favorablement notre système immunitaire. En effet, de récentes découvertes ont été faites concernant les propriétés curatives de certaines plantes dont le *Bupleurum falcatum*, une apiacée japonaise, qui est employée pour combattre les hépatites chroniques et les maladies auto-immunes. Il s'est avéré que les agents à la base de ce phénomène étaient des fragments de rhamnogalacturonane I et II (Yamada, 1989, 2001). De même, du RGI, extrait au départ de citron, a la capacité de retarder les métastases cancéreuses. Ces fragments de pectine modifiée (MCP) riches en galactose, interagissent avec les galectines, des protéines reconnaissant du galactose et présentes à la surface des cellules cancéreuses. Ils saturant les sites de liaison du galactose de ces lectines et inhibent l'agrégation des cellules tumorales ainsi que l'adhésion entre cellules tumorales et cellules normales. De plus, le MCP stimulerait la fixation d'IL-2 aux cellules tumorales, ce qui constitue une étape nécessaire à leur destruction. Enfin, il serait également capable d'augmenter la réponse cytotoxique des « natural killer » et activerait les lymphocytes T

(Kidd, 1996). Il existe encore d'autres exemples de RGI capables de stimuler notre système immunitaire, comme le PMII, une fraction polysaccharidique constituée d'HG et de RGI, extraite du plantain, qui active la voie classique du complément (Michaelson *et al.*, 2000). La découverte de ces composés pariétaux à activité biologique ouvre une voie prometteuse dans la génération de nouveaux traitements contre les maladies auto-immunes et les tumeurs.

Après avoir présenté l'antigène cible de ce travail et montré l'intérêt des anticorps dans le contexte structure-fonction des polymères pariétaux, nous allons maintenant décrire la technique du phage display utilisée pour la production d'Ac dans le cadre de ce travail.

II. Le phage display

Le phage display est une technique mise au point par George P. Smith en 1985 dans le but de permettre la construction et le criblage aisés et rapides de banques de ligands, tels que des peptides ou des fragments d'anticorps (de Haard *et al.*, 1998). Elle permet de découvrir et d'étudier des interactions protéine-protéine, protéine-ADN ou encore de sélectionner et produire des anticorps dont il est possible d'accroître l'affinité. L'objectif de ce mémoire étant d'isoler des Ac par phage display, nous ne discuterons de la technique du phage display que dans ce cadre.

Dans les banques d'anticorps recombinants, chaque phage expose au niveau de son enveloppe un fragment d'anticorps unique qu'il est possible de sélectionner à l'aide de l'antigène approprié (Benhar, 2001). Après avoir isolé un fragment d'Ac particulier, il est possible de le produire de manière relativement facile. Cette technique permet donc l'obtention de fragments d'anticorps monoclonaux. Le phage display complète ainsi la technique des hybridomes (Hinfray, 1998) et sert parfois même d'alternative. C'est particulièrement le cas en recherche végétale dans le domaine de la paroi cellulaire, où il est difficile d'obtenir des anticorps contre les constituants de nature polysaccharidique de la paroi végétale suite à leur manque d'immunogénicité (Willats *et al.*, 2000b). De plus, la technique du phage display couplée à d'autres techniques (telle que la PCR) présente l'avantage de pouvoir améliorer l'affinité de l'anticorps criblé grâce à un processus de maturation réalisé *in vitro* (Hoogenboom, 1997).

II.1 Les phages

II.1.1 Généralités

Les phages sont des virus bactériens, c'est à dire qu'ils sont incapables d'assurer seuls leur réplication et doivent pour cela parasiter une bactérie hôte. La classification des phages repose sur leur morphologie très variable et la nature de leur matériel génétique. Leur génome peut être soit de l'ADN soit de l'ARN, de même qu'il peut être soit simple-brin, soit double-brin. Leur structure n'est pas différente de celle des virus eucaryotes : un ensemble de protéines forme une capsid qui renferme le matériel génétique. Suivant le type de phage, une enveloppe recouvre parfois la capsid (Russel *et al.*, 2004).

Lorsqu'il infecte une bactérie, le phage prend alors le contrôle de la machinerie bactérienne et fait produire par l'hôte tous les éléments nécessaires à sa réplication (séquences nucléiques et protéiques). Une fois mature, le phage quitte la bactérie. Deux stratégies sont utilisées pour en sortir : soit le phage induit la lyse (il s'agit des phages lytiques, exemple : le phage lambda) ; soit le phage s'échappe de la bactérie sans entraîner sa mort (ce sont notamment les phages filamenteux tel que le phage M13) (Hinfray, 1998).

Dans la technique du phage display, les deux principaux types de phages employés sont le phage M13 et moins fréquemment le phage lambda. D'autres phages (P4, T7, T4 et MS2) sont également utilisés mais ils servent alors dans des applications marginales qui ne couvrent que 10% des applications du phage display, il s'agit par exemple de l'exposition de

protéines fluorescentes vertes (Benhar, 2001). Nous avons utilisé dans le cadre de ce travail le phage filamentueux M13K07. Le point suivant de ce chapitre lui est consacré.

II.1.2 Le phage M13

Ce virus à enveloppe renferme un ADN simple-brin circulaire et appartient à la famille des *Inoviridae*, une des principales familles de bactériophages. Il présente un aspect de filament flexible dont la longueur moyenne est d' $1\ \mu\text{m}$ et le diamètre de 6 nm (Figure 12). Son génome de 6,4 Kb code pour 10 protéines qui sont impliquées dans la réplication du virus, dans la morphogénèse et la formation de sa capsid (Russel *et al.*, 2004). La capsid du phage M13 (Figure 12) résulte de l'assemblage de plusieurs protéines dont, notamment, de la protéine PVIII (50 acides aminés), représentée approximativement en 2700 exemplaires, et de la protéine PIII (406 acides aminés) présente en 5 exemplaires et nécessaire à la première étape d'infection (Sidhu, 2001). Dans la technique du phage display, ce sont ces deux protéines qui sont exploitées pour exposer les molécules d'intérêt en surface des phages (Rodi et Makowski, 1999).

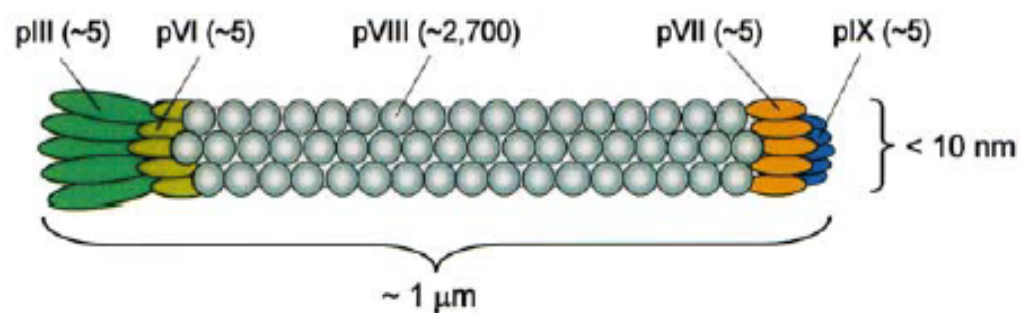


Figure 12 : **Schéma du phage M13 (échelle non respectée)**
(Willats, 2002).

Les phages infectent des bactéries Gram négatives, majoritairement des *Escherichia coli* et plus précisément celles qui portent un plasmide F' et qui sont donc pourvues de pili sexuels. En effet pour que l'infection virale ait lieu, la présence du pilus sexuel chez l'hôte est indispensable puisqu'il constitue le site de fixation reconnu par la protéine pIII du phage qui permet à ce dernier de s'introduire dans la bactérie (Figure 13) (Breitling et Dübel, 1999). L'assemblage des éléments constitutifs du phage M13 se produit au niveau de l'espace périplasmique de la bactérie. Les protéines de la capsid sont arrimées à la paroi interne de la bactérie et leur assemblage se réalise quand une copie répliquée de l'ADN viral s'extirpe de cette dernière, sans en entraîner la lyse (Smith et Petrenko, 1997).

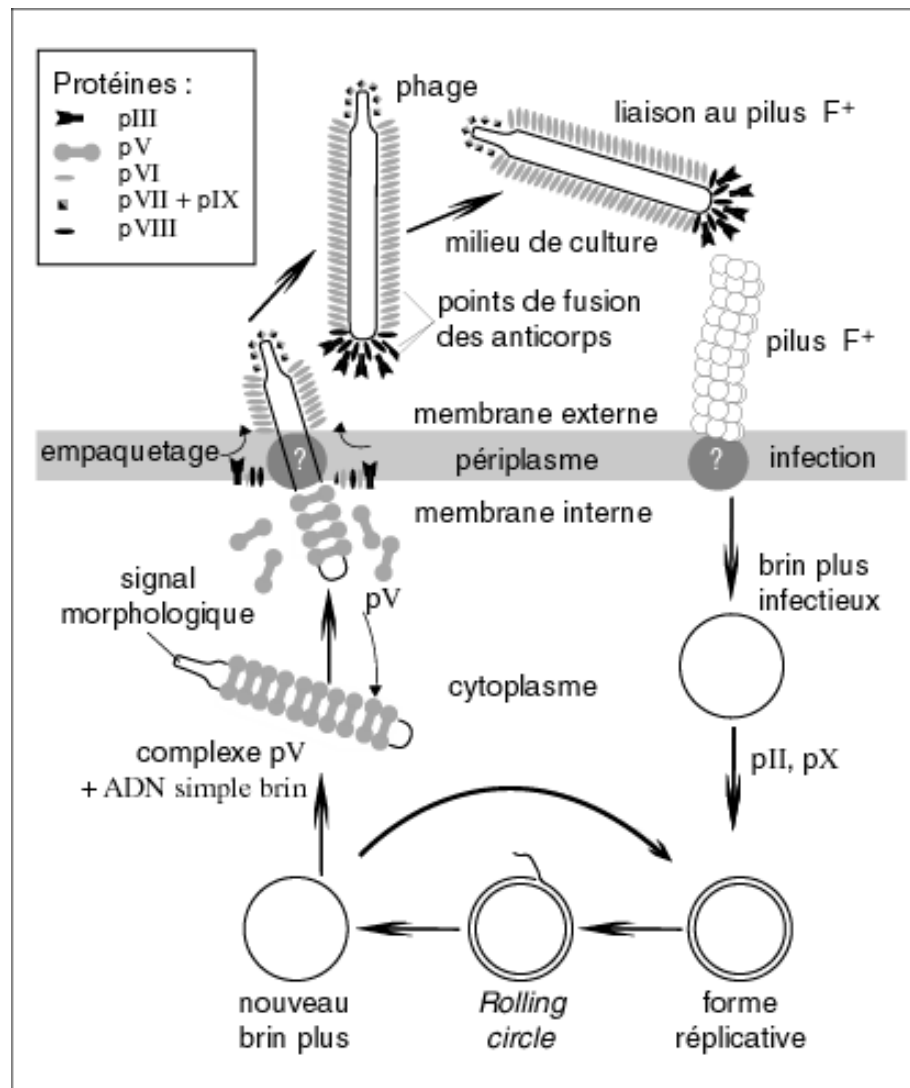


Figure 13 : Cycle de réplication des phages filamenteux
(Breitling et Dubël, 1999).

II.1.3 Les protéines PIII et PVIII

Comme nous l'avons énoncé précédemment, ces deux protéines sont employées pour exposer en surface de phage les fragments d'anticorps d'intérêt. Concrètement, le gène codant pour la séquence d'intérêt est fusionné à l'extrémité 5' des gènes PIII ou PVIII (Rodi et Makowski, 1999). Suivant le mode d'expression des protéines de fusion, les phages sont classés en deux catégories : d'une part, les phages homogènes, phages dont toutes les protéines PIII ou PVIII sont recombinantes, ayant une séquence d'anticorps à l'extrémité N-terminale ; d'autre part, les phages hétérogènes, phages qui expriment à la fois des protéines recombinantes et des protéines sauvages (Smith et Petrenko, 1997). Il est évident que les contraintes stériques des phages homogènes sont plus importantes que celles présentes chez les phages hétérogènes. La conséquence de ces contraintes est que la taille des fragments exposés sur un phage homogène est nettement plus réduite que celle des fragments exprimés à la surface des phages hétérogènes (Willats, 2002).

La protéine PIII, localisée à l'une des extrémités du phage, est idéale pour exposer les anticorps d'intérêt. Cependant, la taille des fragments qui peuvent être exprimés sur ces protéines doit être relativement réduite si on ne veut pas perturber de manière significative la capacité du phage à infecter *E. coli* ou, dans certains cas, entraîner la dégradation de la protéine de fusion dans l'espace périplasmique (Sidhu, 2001). C'est pourquoi, dans le cadre de l'expression d'anticorps, seuls les fragments capables de reconnaître l'antigène [(Fab ou scFv (single chain variable region fragment))] (Figure 14) sont exprimés en surface des phages. Enfin, vu le petit nombre de protéines PIII, cette molécule sera plus fréquemment employée pour exposer des ligands dont l'affinité désirée sera la plus élevée possible. C'est donc préférentiellement à cette protéine que seront fusionnés les fragments d'anticorps alors que la protéine PVIII, qui permet l'exposition d'un grand nombre de ligands, n'est dans ce contexte que peu utilisée.

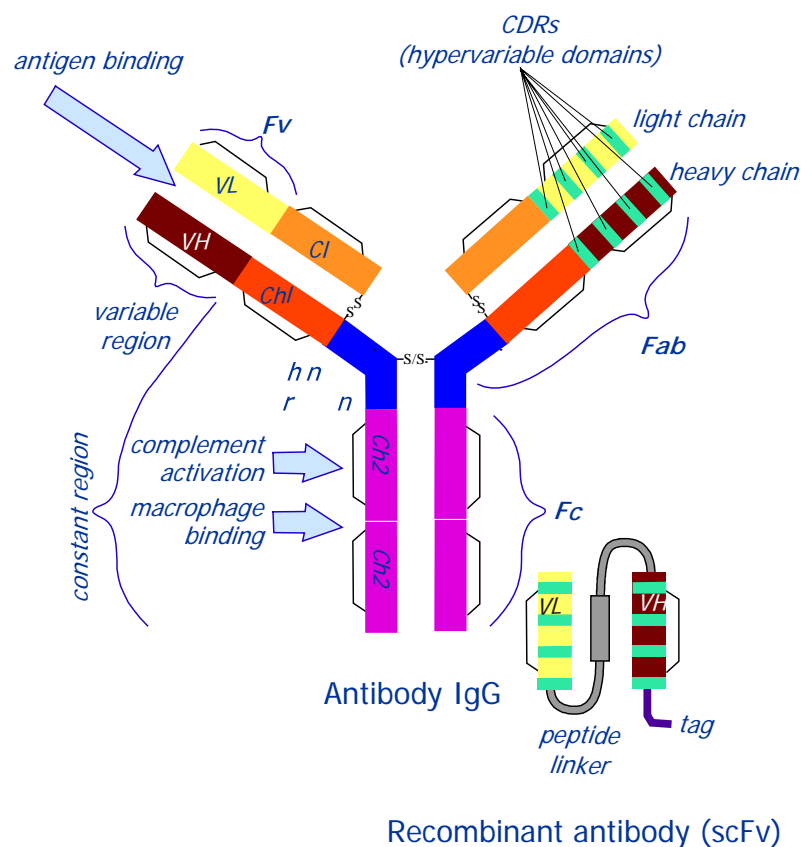
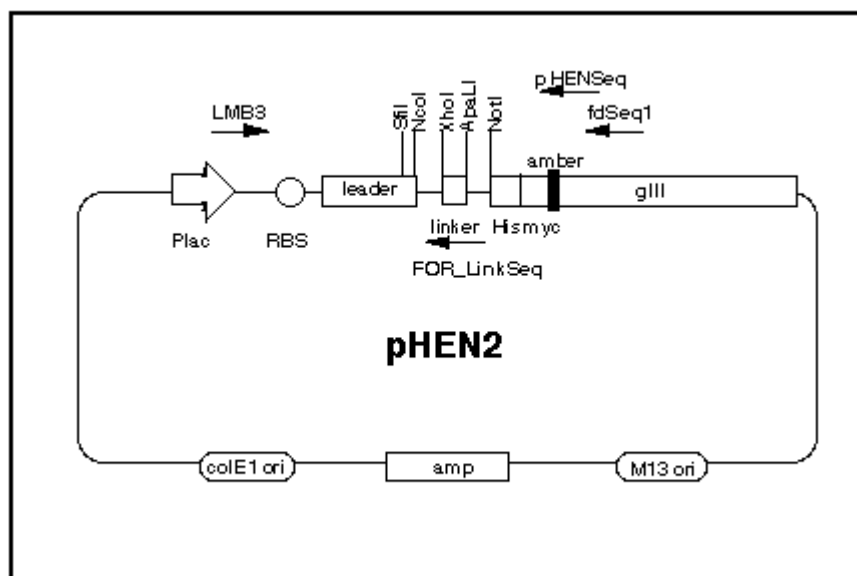


Figure 14 : Schéma d'un anticorps IgG et d'un anticorps recombinant (Dübel et Breitling, 1999).

II.1.4 L'obtention de phages hétérogènes

Dans le cas d'un phage hétérogène, le clonage du gène codant pour un fragment d'Ac est réalisé dans un phagemide : un plasmide doté du gène codant pour la séquence d'intérêt fusionné au gène de la protéine PIII (rarement de la protéine pVIII), d'origines de réplication plasmidique (réplication double-brin) et phagique (réplication simple-brin) et d'un marqueur de sélection (Figure 15). Cette construction est introduite dans des bactéries par électroporation afin de générer des banques (voir II.2). A lui seul, le phagemide est incapable de générer de nouveaux phages (Benhar, 2001). Dès lors, les bactéries transformées doivent

Enfin, l'insertion entre la séquence du gène codant pour un fragment d'anticorps (par exemple, un scFv) et la séquence codant pour la protéine PIII, d'un codon stop ambre (TAG), permet d'obtenir les molécules d'intérêt sous forme soluble ou fixée à la surface des phages en fonction de la souche d' *E. coli* utilisée. Dans une souche dite « non suppressive » (exemple : HB2151), la machinerie de transcription de la bactérie reconnaît ce codon comme un « signal d'arrêt », le scFv est donc relargué dans le milieu. Dans une souche suppressive par contre (exemple : TG1) ce codon n'est pas reconnu et les séquences peptidiques du fragment d'Ac et de la protéine de capsid restent liées (Willats, 2002).



LMB3
 -----> RBS
 TT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT GCA TGC AAA TTC

 pelB leader
 TAT TTC AAG GAG ACA GTC ATA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA
M K Y L L P T A A A G

 SfiI NcoI XhoI
 TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAGGTGCAGCTGCAGGTGACCGACC TCG
L L L L A A Q P A M A S

 FOR_LinkSeq
 <----- ApaLI

```

AGT GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT AGT GCA CAG GTCCAAC
S G G G G S G G G G S G G S A

                NotI      6xHis-tag
TGCAGGAGCTCGATATCAAACGGGCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA
A A A H H H H H H G A A

                pHEN-SEQ
      myc-tag      <-----Amber
GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA
E Q K L I S E E D L N G A A *
                E T V E

                fdSeq1
      <-----
AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT ACA GAA AAT TCA TTT ...
S C L A K P H T E N S F ...

```

Figure 15 : **Représentation schématique du phagemide pHEN2 utilisé pour le clonage des gènes scFv** (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/g1p.html>). Plac : promoteur lac ; RBS : site de liaison des ribosomes ; gIII : gène de la protéine pIII ; M13 ori : origine de réplication du phage M13 ; amp : résistance à l'ampicilline ; colE1 ORI : origine de réplication bactérienne.

II.2 Les banques

La construction de banques, telles que les banques phage display, constitue actuellement un outil fondamental pour l'étude des interactions moléculaires. Vu que notre intérêt ne se porte ici que sur les différentes banques d'anticorps disponibles via le phage display, les paragraphes suivants ne seront consacrés qu'à ces dernières.

II.2.1 Les banques d'anticorps

Dans ces banques, les domaines variables d'un anticorps (V_H et V_L) peuvent être exprimés sous forme de fragments Fab (Griffith *et al.*, 1994) ou, plus couramment, sous forme de fragments scFv (Nissim *et al.*, 1994) au niveau de la capsid des phages. Au cours de ce mémoire nous avons utilisé une banque exprimant des scFv en surface des phages. Le point suivant traite de la construction de ce type de banques.

II.2.2 Construction d'une banque de scFv

Les fragments scFv sont constitués de la zone variable d'une chaîne lourde (V_H) et d'une chaîne légère (V_L) jointes l'une à l'autre par un lien peptidique artificiel (glyc₄-ser)₃ (Figure 14) (Völkel *et al.*, 2001). Ce sont les plus petits fragments capables de reconnaître leur épitope avec une affinité relativement proche de celle d'une région variable de l'anticorps naturel. Les chaînes V_H et V_L qui les composent proviennent du réarrangement naturel de plusieurs gènes. Les gènes variables de la chaîne lourde (les gènes V_H) sont formés suite au réarrangement de trois segments nommés V, D et J ; alors que les gènes variables des chaînes légères κ et λ (V_L) sont le résultat du réarrangement de segments V et J (Breitling et Dübel, 1999).

On distingue dans les banques d'anticorps trois types de banques que l'on peut regrouper en deux classes : les banques immunes et les banques 'single-pot' qui regroupent les banques naïves et les banques synthétiques (Willats, 2002).

La construction des banques immunes nécessite l'utilisation d'un animal hyperimmunisé contre l'antigène cible de l'anticorps recherché. Chez cet animal, la majorité de la population de lymphocytes B produit des immunoglobulines G (IgG) contre la molécule cible. L'ARNm de ces lymphocytes B est isolé avant d'être rétrotranscrit (Figure 16). Par après, les gènes codant pour des V_H et V_L sont amplifiés séparément au moyen d'amorces spécifiques. Ces fragments d'ADN sont ensuite assemblés à l'aide d'une séquence d'ADN qui s'hybride à l'extrémité 3' de la chaîne lourde et à l'extrémité 5' de la chaîne légère (le *linker*). Le produit d'assemblage est alors à son tour amplifié par une PCR, au cours de laquelle des sites de restriction sont ajoutés afin de permettre son clonage dans le phagemide. Ces amplicons sont insérés dans un phagemide par une étape de restriction-ligation et, enfin, le vecteur est introduit par électroporation dans une souche d'*E. coli* compétente. Les bactéries contenant le phagemide sont cultivées par la suite dans un milieu de sélection et infectées avec des phages M13 qui permettent la production de phages recombinants exprimant à leur surface un scFv (Azzazy *et al.*, 2002). Un inconvénient considérable de ce type de banque est qu'il est nécessaire de construire une banque pour chaque molécule cible (Willats, 2002). De plus, la durée nécessaire à l'immunisation de l'animal peut être longue et la réponse immunitaire contre l'antigène est imprévisible.

La construction des banques naïves est très semblable à celle des banques immunes, la seule différence étant que, dans ce cas, le système immunitaire du donneur n'est pas stimulé. Chez un individu sain, la population d'immunoglobuline la plus abondante et qui possède donc la diversité la plus importante, est celle des Ig M. Les amplicons insérés dans les phagemides qui constitueront la banque proviendront donc des ARNm codant pour cette classe d'immunoglobuline qui seront ensuite rétrotranscrits et dont les gènes V seront amplifiés spécifiquement (Hoogenboom et Chames, 2000). Comparée aux banques immunes, une banque naïve a l'avantage de permettre l'isolement dans un délai relativement court, d'anticorps contre des molécules faiblement immunogènes ou toxiques et une seule banque peut être utilisée pour isoler des Ac contre une grande variété d'antigènes.

Enfin, dans le cas des banques synthétiques, l'emploi d'animaux immunisés est également évité. Ici, ce sont soit des ARNm de lignées pré-lymphocytaires, soit des ARNm de gènes V déjà arrangés, issus d'individus sains qui sont isolés avant d'être rétrotranscrits. Par la suite, les séquences correspondant aux chaînes V sont amplifiées spécifiquement et subissent éventuellement des modifications synthétiques (mutation dirigée ou aléatoire) au niveau de leurs régions hypervariables (ou CDR : complementary determining region) qui participent à la reconnaissance de l'antigène : par chaîne lourde et légère, il existe trois CDR, désignées sous les termes CDR₁, CDR₂ et CDR₃ (Nissim *et al.*, 1994). Le contenu et la qualité de ces banques présentent l'avantage par rapport aux banques naïves de ne pas être influencés par le vécu des lymphocytes B donneurs et par la diversité potentiellement limitée des Ig M.

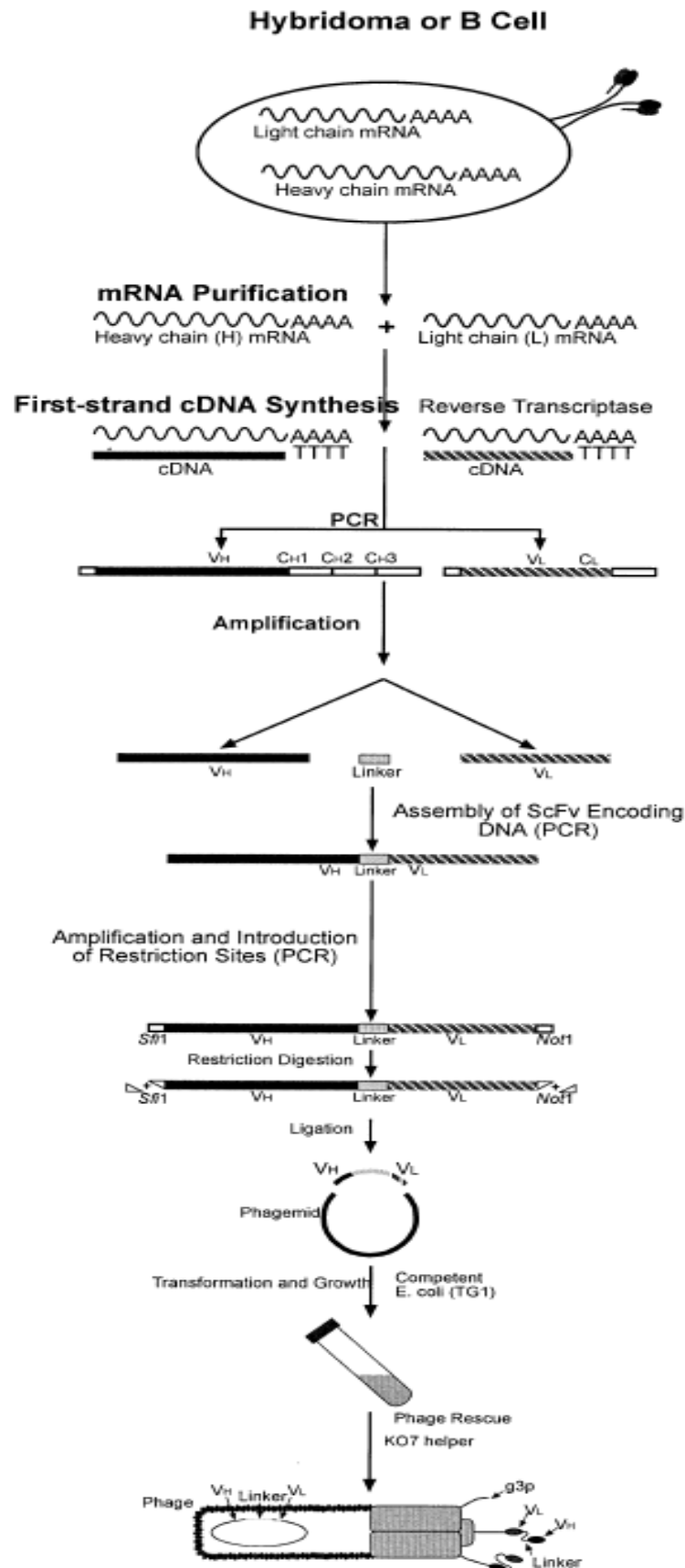


Figure 16 : Représentation schématique de la construction d'une banque immune scFv en utilisant le phage display (Azzazy *et al.*, 2002).

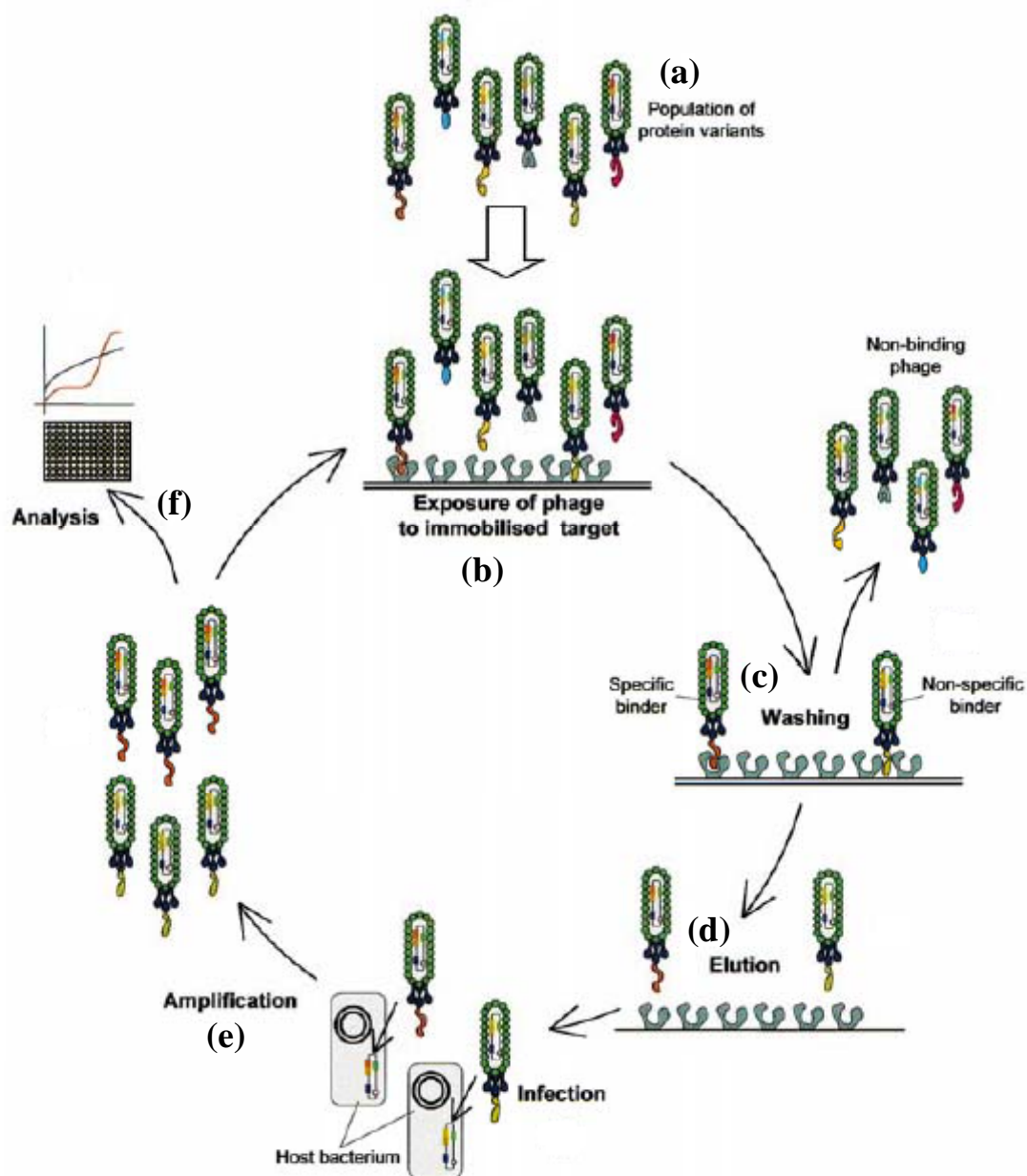


Figure 17 : **Schéma de la réalisation d'un panning**
(Willats, 2002).

Ces banques 'single-pot' présentent, en plus du fait de contenir une diversité plus importante que leurs homologues post-immunitaires, l'avantage de ne pas avoir à supporter les charges éthique et financière qui découlent de l'utilisation d'animaux (Willats *et al.*, 2000).

II.2.3 La sélection

Pour isoler un phage-anticorps intéressant au départ d'une banque, il faut procéder à une sélection d'affinité (aussi désignée sous le terme de bio-panning) (Figure 17). Cette procédure comporte quatre phases. Dans la première, les phages de la banque (Figure 17a), dans laquelle a été empaquetée la population d'amplicons codant pour des fragments d'anticorps sont exposés à l'antigène cible fixé à un support (billes magnétiques,

microplaques ELISA ou encore colonne d'affinité) (Figure 17b). Après une période d'incubation, des lavages sont effectués afin d'éliminer les phages qui soit n'ont pas réagi avec l'antigène, soit ne se sont pas fixés efficacement (leur interaction correspond souvent dans ce cas à des liaisons non spécifiques) (Figure 17c). Ensuite, les phages qui se sont fixés à la cible sont récupérés par élution (Figure 17d) et leur nombre est réamplifié par infection de bactéries hôtes (Figure 17e).

Pour s'assurer que les phages sélectionnés correspondent bien à ceux possédant les ligands spécifiques de l'antigène cible, ces étapes sont répétées en général 4 à 6 fois. A chaque cycle, une nouvelle banque dont la diversité est de plus en plus réduite est créée. Quand l'enrichissement de la banque est jugé suffisant, il est possible d'obtenir un anticorps monoclonal en procédant à un test ELISA monoclonal dans lequel des clones isolés de phage-anticorps sont placés individuellement dans des micropuits prétraités avec l'antigène cible (Hoogenboom et Chames, 2000). Les phages retenus seront ceux ayant produit la réponse la plus intense au cours de ce test (Figure 17f).

II.3 Avantages et inconvénients du phage display

II.3.1 Intérêts du phage display

Un des avantages importants de la production d'anticorps par phage display est qu'à partir du moment où un clone intéressant a été isolé, les anticorps qu'il produit peuvent être obtenus rapidement et massivement à un faible coût, sans devoir utiliser d'équipement particulier. De plus, puisque le phénotype est directement lié au génotype, il est possible par un processus de maturation *in vitro* d'augmenter l'affinité de cet anticorps pour son épitope par mutation dirigée ou aléatoire dans les séquences des CDR.

Grâce à la production de banques de fragments d'anticorps, la technique phage display vient compléter la technique de l'hybridome dans la production d'anticorps monoclonaux et peut parfois même servir d'alternative à cette technique, notamment lorsqu'il est difficile d'obtenir la quantité d'antigènes nécessaire pour produire un anticorps d'hybridome (Shinohara et Fukada, 2002). Ainsi les quantités d'antigènes nécessaires pour sélectionner un anticorps par phage display peuvent parfois être 1000 fois moins importantes que celles utilisées pour produire un anticorps monoclonal par la technique des hybridomes (Willats *et al.*, 2003). A condition d'utiliser une banque naïve, le phage display présente également l'avantage de permettre l'isolement, dans un délai relativement court, d'anticorps contre des molécules faiblement immunogènes.

II.3.2 Limites du phage display

Un des principaux atouts qui rend une banque attrayante est sa taille. En effet, plus cette dernière sera élevée, plus la diversité y sera importante. Or, suite au faible taux de transformations chez *E. coli* ainsi qu'à d'autres limites inhérentes à la bactérie (par exemple : la viabilité, l'action des endoprotéases) et au cycle de réplication du phage au cours de l'étape d'infection, il est difficile d'obtenir, dans la construction d'une banque phage display, une taille supérieure à 10^{11} clones indépendants (la taille moyenne de ces banques est de 10^9) (Shidu, 2002).

Afin de contourner le problème lié à la transformation, diverses stratégies ont été mises au point. Elles ont rendu possible la création de banques contenant jusqu'à 10^{13} clones. Il s'agit notamment des systèmes Cre-lox du phage P1 (Figure 18) et du système att-int du phage lambda. Ces deux systèmes reposent sur un phénomène de recombinaison *in vivo*. Suivant le système, la recombinase Cre ou la protéine int, insère des séquences nucléotidiques dans l'ADN du phage P1 ou λ au niveau de sites spécifiques lox ou att. Cette recombinaison permet un assemblage de répertoires de chaînes lourdes et légères introduites séparément dans la bactérie grâce à deux vecteurs différents. Des deux systèmes, le système att-int a, à l'inverse du système Cre-lox, l'avantage d'être inducible à la chaleur et de mener à une recombinaison irréversible (Hinfray, 1998).

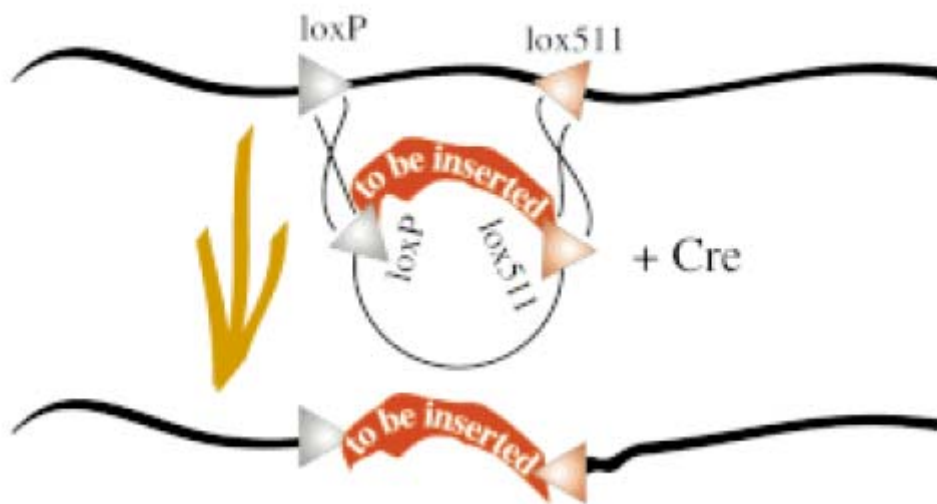


Figure 18 : Le système Cre-Lox
(Nagy, 2000).

Un autre inconvénient de la technique phage display est qu'elle nécessite l'utilisation de la molécule cible sous forme purifiée. De surcroît, la sélection des phages, même lorsqu'elle fournit un résultat, ne mène pas toujours à la découverte d'un ligand intéressant ; *in vivo* la molécule sélectionnée peut perdre ses propriétés. Un moyen de limiter ce problème fréquent est de réaliser le protocole expérimental dans des conditions les plus rapprochées possibles des conditions physiologiques (Willats *et al.*, 2000).

Contrairement aux banques de peptides, aucune banque d'Ac n'est disponible commercialement. Obtenir un anticorps recombinant contre un antigène donné nécessite donc soit de construire une banque immune, ce qui s'avère être une technique complexe et délicate, soit d'essayer de se procurer une banque 'single-pot' auprès de laboratoires leaders en ce domaine, ce qui n'est pas toujours facile, ces outils étant souvent jalousement gardés.

Nous allons, dans ce qui suit, présenter les exemples d'applications du phage display pour l'isolement d'anticorps recombinants dirigés contre des polysaccharides végétaux.

III. Obtention d'anticorps anti-polysaccharides par phage display

Actuellement, la littérature ne décrit que deux anticorps recombinants anti-polysaccharides végétaux isolés par phage display. Ce sont les anticorps CCRC-R1 et PAM1 (Williams *et al.*, 1996 ; Willats *et al.*, 1999a). Notre laboratoire vient de produire un troisième anticorps au moyen de cette méthode, le B3 (Liners et Van Cutsem, soumis). Dans ce point, nous allons brièvement décrire l'obtention de ces trois types d'anticorps.

Le CCRC-R1 a été isolé au départ d'une banque immune de souris exprimant des fragments d'anticorps monovalent (Fab) dont les gènes correspondants ont été clonés dans le vecteur pComb3. Cinq cycles de panning, dans lesquels l'antigène cible était un RGII monomérique couplé à de l'ovalbumine et où l'agent de saturation était de l'ovalbumine, ont permis un enrichissement suffisant de la banque, supérieur à 1000 fois à chaque tour. Un clone spécifique du RGII a été isolé parmi 40 clones analysés, le CCRC-R1 (Williams *et al.*, 1996).

La banque initiale dont est issu l'anticorps PAM1 est une banque synthétique de scFv d'origine humaine dont les gènes correspondants ont été clonés dans le phagemide pHEN1. Dans cette banque, seule la région hypervariable CDR3 des gènes codant pour les V_H a été réarrangée, elle a été remplacée par une séquence nucléotidique aléatoire encodant de 4 à 12 acides aminés (Nissim *et al.*, 1994). Quatre cycles de panning utilisant de la pectine esterifiée à 23% ont permis d'enrichir la banque initiale en phage-anticorps spécifiques environ 1800 fois. Le phage-anticorps PAM1 a alors pu être isolé par ELISA monoclonal parmi 192 clones analysés (Willats *et al.*, 1999a).

Enfin, l'anticorps B3, produit au laboratoire, a été isolé au départ de la banque Griffin 1. Cette banque résulte du clonage de gènes codant pour des scFv d'origine humaine dans le vecteur pHEN2. La diversité de cette banque synthétique trouve son origine dans le réarrangement des gènes codant pour les V_H et les V_L : la région hypervariable CDR3 des différents V_H et V_L humains a été remplacée par une séquence prise au hasard de respectivement 4 à 12 acides aminés pour les V_H, 1 à 3 acides aminés pour les V_L κ et de 0 à 5 acides aminés pour les V_L λ. Les combinaisons de ces différents répertoires réarrangés sous forme de scFv, réalisées par le clonage des gènes correspondants dans un vecteur de type phagemide, donne une banque de $1,2 \cdot 10^9$ clones (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). Cinq cycles de panning ont été réalisés pour enrichir la banque de 640 fois en phage-anticorps spécifiques des carraghénanes. Un phage-anticorps intéressant, nommé B3, a été isolé au départ de la dernière banque enrichie (Liners et Van Cutsem, soumis).

IV. Objectif du mémoire

Comme nous l'avons montré dans l'introduction de ce manuscrit, il existe un véritable intérêt à étudier le RGI, aussi bien pour comprendre son rôle structurel que son intervention dans la régulation de phénomènes tels que la croissance et la différenciation cellulaire. Les anticorps anti-polysaccharides s'avérant être des outils efficaces dans ce cadre d'étude, nous avons donc entrepris d'isoler un anticorps anti-RGI par phage display, cette technique se révélant être prometteuse pour l'obtention d'Ac anti-polysaccharides végétaux.

La banque dont nous disposons pour réaliser ce travail est la même que celle utilisée pour l'obtention de l'anticorps B3 (voir II.4). Une aliquote de cette banque, obtenue auprès du MRC, a été mise en culture afin d'en réaliser des stocks secondaires. Ces derniers ont été directement utilisés dans des procédures de panning permettant l'isolement de phages porteurs de scFv spécifiques du RGI en surface.

Le RGI utilisé dans ce travail a la composition (mol%) suivante : rhamnose 21,1 ; arabinose 1,7 ; galactose 25,2 et acide galacturonique 52,0. Il nous a été aimablement fourni par le Dr Renard (INRA, Le Rheu, France).

Matériel et Méthodes

1. Estimation du titre d'un stock de phage M13

1.1. Matériel

Boîtes de Pétri diamètre 9 cm

Milieux 2xYT, TYE et TYE-top agarose (voir milieux)

Bactéries TG1

Phage M13K07 stock constitué au laboratoire (comme décrit au point 2) à partir d'un lot fournit par AmershamPharmacia Biotech (n°27-9401-01)

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

1.2. Protocole

1. Ensemencer une colonie de bactéries TG1 maintenues sur milieu minimum dans 10 ml de milieu 2xYT. Incuber à 37°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.

2. En parallèle, effectuer des dilutions sériées de phage M13K07 (solution stock : $2,65 \times 10^{13}$ pfu/ml) dans du milieu 2xYT de 10 en 10 depuis 10^2 à 10^{11}

3. Infecter 200 μ l de bactéries TG1 avec 10 μ l d'une solution diluée de phage M13K07. Placer le mélange dans un bain à 37°C durant 30 min. Répéter l'opération pour chaque dilution des phages.

4. Sous hotte, ajouter 3,5 ml de milieu TYE-top agarose aux 200 μ l de bactéries infectées.

5. Vortexer brièvement et couler immédiatement sur boîtes TYE.

6. Laisser une nuit à 37°C. Le lendemain, compter les plages de pseudolyse et estimer le titre du stock de phage (nombre de plage de pseudolyse/boîte x dilution) en pfu/ml.

2. Constitution d'un stock de phage M13

2.1. Matériel

Boîtes de Pétri diamètre 9 cm

Milieux 2xYT, TYE et TYE-top agarose (voir milieux)

Kanamycine préparée à 25 mg/ml en H₂O, filtrée à 0,22 μ m et stockée à -20°C

PEG : polyéthylène glycol 8000 (Sigma). PEG-NaCl: PEG 20%-NaCl 2,5 M. Solution aliquotée, autoclavée et conservée à température ambiante

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

2.2. Protocole

Jour 1

Propagation des phages :

1. Ensemencer une colonie de bactéries TG1 maintenues sur un milieu minimum dans 20 ml de milieu 2xYT. Placer la culture sous agitation à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.

2. Prélever 4 ml de la culture TG1 en phase exponentielle et infecter avec une plage de pseudolyse (obtenue au point 1) isolée au moyen d'une pipette stérile et laisser pousser 2 h à 37°C sous agitation (250 rpm).

3. Infecter 500 ml de milieu 2xYT avec cette culture de 4 ml, laisser pousser 1 h à 37°C sous agitation et ajouter ensuite de la kanamycine (50 μ g/ml final) et laisser pousser une nuit à 37°C sous agitation.

Jour 2*Purification des phages :*

1. Centrifuger 2 x 200 ml de suspension bactérienne à 4°C et à 10800 g pendant 30 min.
2. Récolter les surnageants et y ajouter 40 ml (1/5 vol) de PEG-NaCl. Mélanger et laisser 1 heure dans un mélange eau-glace.
3. Centrifuger 30 min à 10800 g à 4°C, éliminer le surnageant, resuspendre le culot dans 20 ml d'H₂O stérile et ajouter 4 ml (1/5 vol) de PEG-NaCl. Mélanger et incubé dans un mélange eau-glace pendant 30 min.
4. Centrifuger à 10800 g à 4°C pendant 10 min, éliminer le surnageant ainsi que les dernières gouttes de PEG-NaCl à l'aide d'une micropipette.
5. Resuspendre le culot dans 5 ml de Tris-HCl 10 mM pH8-EDTA 1mM, transférer la solution dans des tubes eppendorf et centrifuger 10 min à vitesse maximale à 4°C. Récolter le surnageant, le filtrer sur 0,22 µm et le stocker à 4°C.

3. Sélection des phages ou « panning »**3.1 Matériel**

Boîtes de Pétri diamètre 9 cm et 14 cm

Milieu liquide 2xTY-Glucose 2%-Ampicilline 100µg/ml (voir milieux)

Milieu liquide 2xTY–Ampicilline (100µg/ml)–Kanamycine (50µg/ml) (voir milieux)

Milieu TYE (voir milieux)

Phage M13, lot constitué au laboratoire selon le point 2. Titre : $9,28 \times 10^{13}$ pfu/ml

Stock de la banque du MRC (titre : $1,3 \times 10^9$ cfu/ml).

PEG : polyéthylène glycol 8000 (Sigma). PEG-NaCl: PEG 20%-NaCl 2,5 M. Solution aliquotée, autoclavée et conservée à température ambiante

Rhamnogalacturonane I (RGI) préparé à 1 mg/ml en H₂O et stocké à -20°C

Hydrolysate de caséine: Hammerstein grade (75000-100 000) (ICN n°101289)

Tampon PBS : 100 mM NaCl, 33 mM Na₂HP0₄, 17 mM NaH₂PO₄.2H₂O, pH 7,2

Tampon PBS - Tween : Tampon PBS additionné de 0.1 % Tween 20

Triéthylamine (sigma)

Plaques de microtitration en polystyrène: Nunc-Immuno module Maxisorp F-8 (n°4-69949)

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

3.2 Protocole

Nous présentons ici le protocole de base de panning de la banque du MRC tel qu'utilisé précédemment dans notre laboratoire pour l'isolement de phages recombinants dirigés contre des polysaccharides chargés. Les différentes modifications apportées à ce protocole sont présentées et discutées dans la partie « résultats » de ce travail.

Jour 1*Amplification de la banque et production des phages :*

1. Ensemencer 100 ml de milieu 2xTY-Glucose-Ampicilline avec un volume de suspension bactérienne équivalent à 5 à 7 10^9 bactéries au départ d'un stock secondaire de la banque du MRC gardé à -80°C et vérifier que la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de la culture est bien inférieure ou égale à 0,05.
2. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la DO_{600nm} soit comprise entre 0,4 et 0,6 (environ 2 h).

3. Transférer environ 20 ml de la culture (volume correspondant à environ 10^{10} bactéries) dans un tube de 50 ml et y ajouter des phages M13 de manière à ce que ces derniers soient présents en quantité 20 fois supérieure aux bactéries. Mettre dans un bain à 37°C pendant 30 min.
4. Centrifuger à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C , éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension dans 200 ml de milieu 2xTY-Ampicilline-Kanamycine. Cultiver une nuit à 30°C sous agitation.

Immobilisation de l'antigène en vue de la sélection :

Distribuer, dans 3 puits d'une boîte de microtitration, 100 μl d'une solution de polysaccharide, en l'occurrence du RGI à 100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Distribuer, dans 3 autres puits « contrôles », 100 μl d'une solution d'hydrolysate de caséine 1% en tampon PBS. Incuber une nuit à 4°C .

Jour 2

Purification des phages :

1. Centrifuger les 200 ml de suspension bactérienne cultivée durant la nuit à 10 800g pendant 10 min à 4°C .
2. Récolter le surnageant et y ajouter 40 ml (1/5 vol) de PEG-NaCl. Mélanger et incuber 1h dans un mélange eau-glace.
3. Centrifuger à 10800g pendant 30 min à 4°C , éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 20 ml d' H_2O stérile et y ajouter 4 ml (1/5 vol) de PEG-NaCl. Mélanger et incuber 30 min dans un mélange eau-glace.
4. Centrifuger à 10800g pendant 10 min à 4°C , éliminer soigneusement le surnageant.
5. Resuspendre le culot dans 2.5 ml de Tris-HCl 10 mM pH8-EDTA 1mM, transférer la solution dans des tubes eppendorf et centrifuger 10 min à vitesse maximale à 4°C . Récolter le surnageant, le filtrer sur 0,22 μm et le stocker à 4°C jusqu'à incubation avec l'antigène (qui doit avoir lieu impérativement dans les heures qui suivent).

Panning des phages en micropuits :

1. Éliminer les solutions de RGI et d'hydrolysate de caséine des micropuits et laver ces derniers une fois en tampon PBS.
 2. Déposer 250 μl de caséine 1% en PBS par puits et incuber 2h à température ambiante. Éliminer la solution de saturation des micropuits et laver ces derniers une fois en tampon PBS.
 3. Déposer dans chaque puits 100 μl d'une solution de phages dilués 10x en hydrolysate de caséine 1% en PBS et pré-incubés 30 min sous agitation à 25°C .
 4. Après deux heures d'incubation à 25°C , éliminer la suspension de phages des micropuits et laver ces derniers 10 fois en tampon PBS-Tween et 10 fois en tampon PBS seul.
- NB. : L'intensité de ces lavages est doublée dans les cycles ultérieurs de panning.
5. Déposer 100 μl par puits d'une solution extemporanée de triéthylamine 100 mM en H_2O , de manière à éluer les phages retenus sur les molécules immobilisées dans les micropuits. Incuber 10 min à température ambiante et, pendant ce temps, préparer deux tubes eppendorf contenant 300 μl de Tris 1M pH 7.4 (solution de neutralisation).
 6. Après les 10 min d'incubation, transférer immédiatement les 3 fois 100 μl de phages élués à partir des puits coatés avec les polysaccharides dans le premier tube eppendorf (on a un stock de 600 μl de phages « positifs »). Transférer également les 3 fois 100 μl de phages élués à partir des puits coatés avec l'hydrolysate de caséine dans le second tube eppendorf (on a un stock de 600 μl de phages « contrôles »).

Titration des différents stocks de phages et ré-amplification de la banque :

Ensemencer une colonie de bactéries TG1 maintenue sur milieu minimum dans 10 ml de milieu 2xTY. Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.

a) Infection par le stock de phages avant panning : diluer ce stock de phages 1000 fois (1 μ l dans 1ml de milieu 2xTY), prendre 1 μ l de cette solution diluée et infecter 1 ml de la suspension bactérienne TG 1. Incuber 30 min dans un bain à 37°C. Titration : sur de petites boîtes de Pétri contenant du milieu TYE additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de 2% de glucose, étaler 50 μ l de la suspension bactérienne infectée, respectivement non diluée, diluée 100x et diluée 10000x dans le milieu 2xTY. Placer les boîtes de culture dans une étuve à 30°C pour la nuit.

b) Infection par le stock de phages « positifs » élués : prendre les 600 μ l de phages « positifs » et infecter 2 ml de la suspension bactérienne TG1. Incuber 30 min dans un bain à 37°C.

Titration : sur de petites boîtes de Pétri contenant du milieu TYE additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de 2% de glucose, étaler 50 μ l de la suspension bactérienne infectée, diluée respectivement 10, 100, 1000 et 10000x dans le milieu 2xTY. Ré-amplification: centrifuger le reste de la suspension bactérienne infectée pendant 10 min à 3500 rpm à 4°C, remettre le culot en suspension dans 1200 μ l de milieu et étaler 4 x 300 μ l sur de grandes boîtes de Pétri contenant du milieu TYE additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de 2% de glucose. Placer les boîtes de culture dans une étuve à 30°C pour la nuit.

NB. : pour les pannings ultérieurs, remettre le culot en suspension dans 1500 μ l de milieu et étaler 5 x 300 μ l sur de grandes boîtes de Pétri contenant du milieu TYE additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de 2% de glucose.

c) Infection par le stock de phages « contrôles » élués: idem phages « positifs ».

d) Contrôle sur bactéries TG1 : prendre 100 μ l de bactéries TG 1 non infectées par les phages et les étaler sur une petite boîte de Pétri contenant du milieu TYE additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline et de 2% de glucose. Placer la boîte de culture dans une étuve à 30°C pour la nuit. Aucune colonie ne doit être observée dans ces conditions.

Jour 3*Récupération de la banque positive ré-amplifiée résultant du panning :*

1. Laisser les boîtes de Pétri contenant la banque à 30°C toute la matinée pour permettre à toutes les colonies de pousser. Si ces colonies sont déjà confluentes, estimer les titres des différents stocks et procéder directement à leur récupération.

Estimation des titres des stocks : Compter le nombre de colonies qui sont présentes sur les petites boîtes de Pétri correspondant aux différentes dilutions des bactéries TG 1 infectées respectivement soit par le stock de phages avant panning, soit par le stock de phages «positifs» élués ou soit par le stock de phages «contrôles» élués. Le titre (nombre de clones de chaque type de stock) est exprimé en nbre cfu (colony forming units)/ml. Le titre du stock de phage doit être au minimum de l'ordre de 10^{12} à 10^{13} pfu (plaque forming units)/ml.

2. Déposer 7 ml de milieu 2xYT (sans glucose ni ampicilline) maintenu à 30°C par grande boîte de Pétri directement sortie de l'étuve à 30°C. Racler les bactéries avec un râteau, récupérer les suspensions bactériennes ainsi obtenues et les transférer dans un tube disponible de 50 ml. Répéter l'opération en déposant 5 ml de milieu par boîte.

3. Diluer la suspension bactérienne contenue dans le tube de 50 ml avec le milieu 2xYT de manière à obtenir une valeur de DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6. Calculer le nombre de bactéries présentes dans la suspension en sachant qu'une DO_{600nm} de 1 correspond à 8.10^8 bact/ml.

4. Aliquoter cette suspension dans des cryotubes de manière à ce que le nombre de bactéries présentes dans chaque cryotube couvre au minimum d'un facteur 10 à 100 la diversité de la

banque (indiquée par le titre de celle-ci). Pour ce faire, concentrer les bactéries par centrifugation 10 min à 3500 rpm à 4°C. Resuspendre le culot dans le volume de milieu 2xTY approprié (conservé à 4°C), aliquoter par 500 µl dans des cryotubes et y ajouter 500 µl de milieu 2xYT-glycérol 30% froid (conservé à 4°C). Mettre les tubes sur glace et lorsqu'ils sont tous prêts, les transférer à -70°C pour conservation.

Production de phages en vue d'un autre tour de panning

Reprendre à partir du schéma expérimental décrit pour le jour 1 en repartant de la banque ré-amplifiée issue du premier tour de panning.

4. ELISA de phages polyclonaux

4.1 Matériel

Plaques de microtitration en polystyrène (Nunc-Immuno module Maxisorp F-8; n° 4-69949)
Hydrolysate de caséine (Hammerstein), poudre de lait (Régilait), BSA : Bovine Serum Albumine (Sigma: A-4503), RGI préparé à 1mg/ml en H₂O et stocké à -20°C.

Tampon PBS : 100 mM NaCl, 33 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄.2H₂O, pH 7,2

Anticorps monoclonal de souris anti-M13-HRP: kit Detection module/ Recombinant Phage Antibody System, Amersham Pharmacia Biotech, n° 27-9402

K-blue substrate-TMB ; Neogen Corporation, Lexington KY USA; n0300177

Lecteur Titertek multiscan; Dade Behring S.A., Belgique

4.2 Protocole

Jour 1

1. Déposer 100 µl par puits de RGI dilué à 100 µg/ml en PBS. En parallèle, dans la même boîte, des puits contrôles sont coatés avec 100 µl d'une solution protéique composée soit d'hydrolysate de caséine 1% en PBS, de BSA 3% en PBS ou de poudre de lait 1% en PBS.
2. Laisser une nuit à 4°C.

Jour 2

1. Eliminer le contenu des puits et laver ceux-ci 1 fois en PBS (250 µl/ puits)
2. Bloquer l'adsorption non spécifique en déposant dans les puits 250 µl d'une solution composée soit d'hydrolysate de caséine 1%, soit de BSA 3%, soit de poudre de lait 1 % en PBS. Laisser 2 h à 25°C.
3. Pré-incuber sous agitation pendant 30 min à 25°C des solutions de phages stock avant panning I, II, III ou IV dilués 10x avec la protéine adéquate (hydrolysate de caséine 1%, BSA 3%, poudre de lait 1%). En parallèle, des solutions de protéines de saturation sont pré-incubées de la même façon.
4. Laver les puits 3 fois en PBS.
5. Déposer 100 µl d'une des solutions de phages dilués et pré-incubés dans les puits coatés avec du RGI ou avec les protéines contrôle. Pour chaque condition de saturation testée, les puits coatés soit avec du RGI ou avec les autres protéines de contrôle ne sont pas mis en contact avec les phages mais avec les solutions de saturation pré-incubées (voir point 3) de manière à vérifier les fixations non spécifiques des Ac secondaires.
6. Incuber 2h à 25°C et laver 3 fois les puits en PBS-Tween 20 0,1% et 3 fois en PBS.
7. Déposer dans les puits des anticorps anti-M13 couplés à la peroxydase dilués 5000x dans les protéines de saturation. Incuber 1h à 25°C.
8. Laver 3 fois en PBS-Tween 20 0,1% et ensuite 3 fois en PBS.
9. Pour la révélation, déposer 100 µl de Kblue substrate dans chaque puits. Laisser 30 min à l'obscurité.
10. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl par puits d'HCl 1M et faire la lecture à 450 nm.

5. ELISA monoclonal

5.1 Matériel

Milieu liquide 2xTY-Glucose 2%-Ampicilline 100µg/ml (voir milieux)

Milieu liquide 2xTY –Ampicilline (100µg/ml) –Kanamycine (50µg/ml) (voir milieux)

Boîtes de culture 96 puits, forme en V, Costar (Corning, n° 3894)

Plaques de microtitration en polystyrène (Nunc-Immuno module Maxisorp F-8; n° 4-69949)

Sérum de veau (Greiner, Batch n°3125093)

Rhamnogalacturonane I stock préparé à 1 mg/ml en H₂O et conservé à -20°C.

Tampon PBS : 100 mM NaCl, 33 mM Na₂HP0₄, 17 mM NaH₂P0₄.2H₂O, pH 7,2

Titertek multiscan; Dade Behring S.A., Belgique

5.2. Protocole

Culture des bactéries (Jour 1)

1. Distribuer 100 µl de milieu liquide 2xYT-Glucose-Ampicilline dans les puits centraux de la boîte de culture et 100 µl d'H₂O stérile dans les puits du pourtour, de manière à limiter l'évaporation.
2. A l'aide d'une pipette, prélever individuellement 60 colonies résultant des pannings et les distribuer dans les puits centraux de la boîte de culture. Cultiver une nuit à 30°C, sous une agitation de 130 rpm.

Infection par les phages (Jour 2)

1. Distribuer, dans les 60 puits centraux d'une boîte de culture, 200 µl de milieu liquide 2xYT-Glucose-Ampicilline contenant 0.5 10⁹ pfu de phage M13/ml. Distribuer 200 µl d'H₂O stérile dans les puits du pourtour.
2. Transférer 20 µl des cultures bactériennes saturées des 60 puits de la première boîte dans 60 autres puits de la seconde boîte. Sceller et stocker la première boîte à 4°C.
3. Après deux heures de culture à 37°C sous une agitation de 130 rpm, centrifuger la seconde boîte à 800 g pendant 10 min à 4 °C.
4. Enlever complètement le surnageant de chaque culot à la pipette (tout le milieu contenant du glucose doit être enlevé) et ajouter dans chacun des 60 puits contenant ces culots bactériens, 200 µl de milieu 2xYT-Ampicilline-Kanamycine. Cultiver une nuit à 30°C sous une agitation de 130 rpm.

Préparation de l'ELISA (Jour 2)

Préparer en parallèle deux boîtes de microtitration: déposer dans l'une 100 µl par puits de RGI à 100 µg/ml en tampon PBS. Dans l'autre, déposer 100 µl de sérum de veau 10% en PBS. Laisser une nuit à 4°C.

Réalisation de l'ELISA (Jour 3)

1. Eliminer le contenu des puits et laver ceux-ci 1 fois en PBS (250 µl/ puits)
2. Bloquer l'adsorption non spécifique en déposant dans les puits 250 µl d'une solution de sérum de veau 10% en PBS. Laisser 2 h à 25°C.
3. Déposer 250 µl de sérum de veau 10% en PBS dans les puits d'une boîte de culture Costar : elle servira à la dilution des phages monoclonaux avant leur dépôt dans les puits de la boîte ELISA. Laisser incubé 1h30 à 25°C.
4. Dilution des phages: déposer dans les 60 puits centraux de la boîte Costar 20 µl de tampon PBS concentré 10x et additionné de 20 µl de sérum de veau 50%. Ajouter dans ces puits 160 µl de suspension de phages provenant de la culture de nuit centrifugée à 800g pendant 10 min

à 4°C. On obtient ainsi une suspension de phages dilués 10x dans une préparation de sérum de veau 10% en PBS 1x. Pré-incuber 30 min à température ambiante sous agitation (400 rpm).

5. Incubation des phages dans les microplaques ELISA, lavages, incubation avec l'anticorps secondaire anti-M13-HRP et révélation: idem ELISA polyclonal.

6. Analyse des clones de la banque : PCR sur colonies

6.1. Matériel

PCR buffer 10x concentré (Roche), dNTP Mix (10mM) (Roche), Taq polymérase 5U/μl (Roche), amorces : pHEN-SEQ (100 pmol/ μl) et LMB3 (100 pmol/ μl), la séquence de ces amorces est présentée dans la partie introduction. Appareils PCR : Minicycler TM (MJ Research, biozym) ou PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, biozym)
Tubes PCR 0,2 ml (AxyGen, Inc., n°Cat. PCR-02-A)

6.2. Protocole

1. Dans un tube eppendorf, préparer x fois le mélange PCR suivant sur glace : 5 μl de PCR buffer 10x ; 2 μl de dNTP Mix ; 1,25 μl de MgCl₂ 50mM ; 1 μl primer pHEN-SEQ ; 1 μl primer LMB3 ; 0,5 μl Taq polymérase et compléter à 50 μl avec H₂O.
2. Vortexer brièvement et distribuer x fois 50 μl de cette solution dans x tubes PCR. Placer ces tubes sur glace.
3. Sous hotte, piquer dans une colonie avec un tips et plonger celui-ci dans un tube contenant du mélange PCR. Disperser les bactéries dans la solution par aspiration-refoulement. Répéter l'opération x fois.
4. Mettre les x tubes dans l'appareil PCR et effectuer la réaction suivante : 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 60°C et 2 min à 72°C. Terminer par une élongation de 10 min à 72°C.
5. Déposer 5 μl du produit PCR sur gel d'agarose analytique (1%).

7. Extraction des protéines du phage M13

7.1. Matériel

Tampon d'extraction (5x) : Tris 250 mM, DDT 500mM, SDS 10%, β-mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50% (pH 6,8)

Milieux 2xYT, TYE, TYE-top agarose (voir milieux)

PEG : polyéthylène glycol 8000 (Sigma). PEG-NaCl: PEG 20%-NaCl 2.5 M. Solution aliquotée, autoclavée et conservée à température ambiante.

H₂O stérile, kanamycine (25 mg/ml)

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

Sonicateur "Bandelin Sonoplus": HD2070, Bandelin electronic, Germany

Ultraturrax T25, Janke & Kunkel, Germany

7.2. Protocole

Jour 1

Propagation des phages :

voir 2.2. (constitution d'un stock de phage M13)

Jour 2

Purification des phages :

voir 2.2. (constitution d'un stock de phage M13) à l'exception de l'étape finale où le culot de phages est remis en suspension dans 10 ml de tampon d'extraction (concentré 1x).

Extraction protéique :

1. Chauffer les échantillons à 100°C pendant au moins 10 minutes, les mettre sur glace et casser les bactéries par sonication pendant 1 minute à une puissance de 40%. Répéter cette dernière opération 3 fois.

2. Placer ensuite l'échantillon à -20°C.

Vérification de la lyse des phages :

1. Ensemencer 10 ml de milieu 2xYT avec une colonie TG1 et cultiver les bactéries à 37°C sous agitation. Laisser pousser jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.

2. Préparer des dilutions sériées de phages purifiés repris dans le tampon dans du milieu 2xYT de 100 en 100 jusque 10^{12} .

3. Infecter 200 µl de bactéries TG1 avec 10 µl des solutions de phages diluées ou avec 10 µl de la solution d'extraits protéiques et les incubent 30 min dans un bain à 37°C.

5. Ajouter aux bactéries infectées 3,5 ml de milieu TYE-top agarose maintenu à 42°C, vortexer immédiatement et couler sur le milieu TYE. Procéder de la même manière pour tous les échantillons. Laisser une nuit à 37°C.

6. Le lendemain, effectuer les comptages. Normalement, on ne doit observer aucune plage de pseudolyse sur le milieu contenant les bactéries infectées par l'extrait protéique.

8. Dosage des protéines extraites des phages M13

8.1 Matériel

stock BSA préparé à 1,25 mg/ml en H₂O et stocké à -20°C

Protein assay, dye reagent concentrate (réactif Bradford) : Bio-rad, n°500-0006

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

8.2. Protocole

1. Préparer des solutions de BSA : 0,2 mg/ml ; 0,4 mg/ml ; 0,6 mg/ml et 0,8 mg/ml en tampon PBS. Ces solutions serviront d'étalon de mesure.

2. Déposer 100 µl de chaque solution de BSA dans un tube à essai en verre et en parallèle, déposer 100 µl d'échantillon à doser dans un autre tube. 100 µl de PBS sont déposés dans un autre tube, ils servent de contrôle.

3. Ajouter 5 ml de réactif Bradford préalablement dilué 5x en H₂O. Vortexer et laisser reposer 5 minutes.

4. Transférer dans des cuvettes de dosage et lire l'absorbance à 595 nm

Tableau 2 : Représentation des conditions testées pour évaluer la toxicité de l'extrait protéique du phages M13 sur la viabilité des phages. Dépôt des antigènes : les puits A à D sont coatés avec de l'hydrolysate de caséine 1%, les puits E à H sont coatés avec une solution d'extrait protéique de phages M13K07 (EP M13) diluée 10x en PBS. Saturation des puits : les puits sont saturés avec une solution d'EP M13 diluée 10x en PBS (0,53 mg/ml) dans les puits 1 à 3, 20x (0,27 mg/ml) dans les puits 4 à 6, 40x (0,14 mg/ml) dans les puits 7 à 9 et 80x (0,07 mg/ml) dans les puits 10 à 12. Dépôt des phages : les phages provenant du stock de phages III avant panning II (voir résultats) sont dilués 10x en PBS dans une solution d'EP M13, elle-même, diluée 10x dans les puits des lignes B et E, 50x dans les puits des lignes C et F et 100x dans les puits des lignes D et G. Du PBS est déposé dans les puits des lignes A et H qui servent de contrôles.

			Saturation : protéines M13 concentrées (mg/ml)												Phages dilués 10x dans EP M13 dilué :
			0,53			0,27			0,14			0,07			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
c o n t r ô l e	Hydrolysate de caséine 1% en PBS	A													Ctl
		B													10x
		C													50x
		D													100x
	EP M13 dilué 10x en PBS	E													10x
		F													50x
		G													100x
		H													Ctl

9. Test de viabilité des phages dilués dans l'extrait protéique du phage M13 en fonction de la concentration et effet de la saturation sur la sélection des phages

9.1. Matériel

Boîtes de Pétri diamètre 9 cm et 14 cm

Milieu liquide 2xTY-Glucose 2%-Ampicilline 100µg/ml (voir milieux)

Milieu liquide 2xTY-Ampicilline (100µg/ml)-Kanamycine (50µg/ml) (voir milieux)

Milieu TYE (voir milieu)

Stock de phage III (issu de la banque 2) du panning II.

Hydrolysate de caséine: Hammerstein grade (75000-100 000) (ICN no. 101289)

Extrait protéique de phages M13 dilué 10 x en tampon d'extraction (0,53 mg/ml)

Tampon PBS : 100 mM NaCl, 33 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄.2H₂O, pH 7.2

Tampon PBS - Tween : Tampon PBS additionné de 0.1 % Tween 20

Plaques de microtitration en polystyrène: Nunc-Immuno module Maxisorp F-8 (n°4-69949)

Spectrophotomètre UV-1601PC (P/N 206-67001); Shimadzu, Germany

9.2. Protocole

Jour 1

Préparation des puits

Distribuer dans des puits d'une boîte de microtitration 100 µl d'hydrolysate de caséine 1% en PBS ou 100 µl d'extrait protéique du phage M13 dilué 10x en tampon PBS (voir tableau 2). Incuber une nuit à 4°C.

Jour 2

Exposition des phages aux différentes conditions testées

1. Eliminer les solutions de protéines des puits et les laver une fois en tampon PBS.
2. Déposer 250 µl par puits d'extrait protéique M13 dilué 10x, 20x, 40x ou 80x suivant le canevas présenté en tableau 1 et incuber 2 h à 25°C.
3. Eliminer les solutions de saturation des micropuits et laver ces derniers une fois en tampon PBS.
4. Pré-incuber 30 min sous agitation à 25°C des phages (provenant du stock de phages III du panning II (voir résultats) dilués 10x en extrait protéique M13K07 lui-même dilué 10x, 50x ou 100x en PBS suivant le modèle présenté en tableau 1. Déposer 100 µl par puits de ces solutions de phages et incuber 2 h à 25°C.
5. Eliminer la suspension de phages des micropuits et laver ces derniers 3 fois en PBS-Tween 0,1% et 3 fois en PBS.
6. Déposer 100 µl par puits d'une solution extemporanée de triéthylamine 100 mM en H₂O. Après une incubation de 10 min à température ambiante, transférer immédiatement 3x 100 µl de phages élués dont les conditions d'incubation (antigène, saturation, dilution de l'extrait protéique du phage M13) sont identiques dans un eppendorf contenant 300 µl de Tris-HCl 1 M pH 7,4. Répéter l'opération pour chaque condition testée.

Estimation du titre des « stocks » de phages :

- 1.ensemencer 10 colonies de bactéries TG1 maintenues sur un milieu minimum dans 100 ml de milieu 2xYT, incuber à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.
2. Par condition testée, infecter 2 ml de culture bactérienne avec les 600 µl de phages et incuber 30 min dans un bain à 37°C.
3. Etaler 25 µl de la suspension bactérienne infectée sur un milieu TYE-glucose 2%-ampicilline 100 µg/ml.
4. Placer les boîtes dans une étuve à 30°C pour la nuit. Le lendemain, compter le nombre de colonies présentes sur les milieux de culture.

10. Milieux et solutions stocks

Milieux

a) Milieu minimum : Préparer deux solutions : solution A : Na₂HPO₄ 12 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, NH₄Cl 2 g/l, pH 7,4 ; solution B : agar 30 g/l. Après autoclavage, les 2 milieux sont placés 30 min dans un bain à 50°C pendant un minimum de 30 min et ensuite mélangés. Sous hotte, ajouter x ml de MgCl₂ 1M, de CaCl₂ 1M et de Thiamine-HCl 1M de manière à ce que leur volume final soit de 1mM. Faire de même avec du glucose 20%, son volume final doit être de 0,1%.

b) Milieu TYE : NaCl 8 g/l, (bacto)Tryptone 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, agar 15 g/l

c) Milieu TYE-top agarose: NaCl 8 g/l, (bacto)Tryptone 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, Agarose 7 g/l Les solutions sont autoclavées et ensuite placées dans un bain à 50°C. Le milieu TYE en est extrait au bout de 30 min et est « coulé » dans des boîtes de Pétri sous hotte. Le milieu de top agarose est laissé dans un bain à 42°C jusqu'à utilisation.

e) Milieu 2xYT : NaCl 5 g/l, (bacto)Tryptone 17 g/l, Yeast extract 10 g/l. Le milieu est autoclavé.

g) Milieu liquide 2xYT-Glucose 2%-Ampicilline 100 µg/ml : milieu 2xYT additionné de glucose 2% et d'ampicilline 100 µg/ml

h) Milieu liquide 2xYT–Ampicilline (100 µg/ml)–Kanamycine (50 µg/ml) : milieu 2xYT additionné d'ampicilline 100 µg/ml et de Kanamycine (50 µg/ml)

Stocks

Toutes les solutions stocks citées ici (Glucose 20%, MgCl₂ 1 M, thiamine-HCl 1 M, Ampicilline 100 mg/ml, Kanamycine 25 µg/ml, CaCl₂ 1M) sont filtrées à 0,22 µm et stockées à -20°C, à l'exception du CaCl₂ qui est stocké à 4°C.

Résultats

III. Résultats

Avant de présenter les résultats obtenus dans le cadre de ce travail, nous allons décrire de manière succincte les principales étapes de la procédure de panning utilisée. Un cycle complet de panning s'effectue en trois jours. Le premier jour, la banque Griffin 1 est mise en culture en présence de glucose [répression du promoteur lac situé en amont du cadre de lecture du gène de fusion dans le phagemide pHEN2 (Figure 15)] et d'ampicilline (marqueur de sélection). Arrivée en phase de croissance exponentielle, la culture bactérienne est ensuite infectée par des phages helper (M13K07) de façon à produire des particules de phages recombinants exposant à leur surface des scFv fusionnés à la protéine pIII, sélectionnées en présence d'ampicilline et de kanamycine, l'absence de glucose dans le milieu de culture permettant cette fois la transcription du gène de fusion. En parallèle, trois puits d'une boîte de microtitration sont recouverts avec du RGI et trois autres avec une protéine « contrôle » qui servent à vérifier la spécificité de l'enrichissement des populations de phages au cours des cycles.

Le deuxième jour, les phages produits au départ de la banque sont purifiés par précipitation au PEG-NaCl et, après pré-incubation avec la protéine contrôle, sont incubés dans les puits recouverts soit avec du RGI (puits positifs) soit avec la protéine contrôle (puits négatifs). Ces puits ont été au préalable saturés avec cette même protéine de manière à éviter les fixations non spécifiques des phages sur le support solide. Après deux heures d'incubation, les puits sont lavés afin d'éliminer les phages en excès ou faiblement fixés sur les antigènes cibles ou contrôles. Les phages retenus sont élués par incubation avec de la triéthylamine à pH 12. Les phages élués provenant respectivement des puits positifs et négatifs servent à infecter des bactéries TG1 en phase exponentielle de croissance de manière à générer une banque secondaire dite « positive » (bactéries TG1 infectées par les phages élués des puits positifs, recouverts avec du RGI) et une banque secondaire dite « négative » (bactéries TG1 infectées avec les phages élués des puits négatifs, recouverts avec la protéine contrôle). Ces bactéries sont étalées sur un milieu sélectif contenant du glucose et de l'ampicilline. Différentes dilutions de bactéries infectées sont étalées sur de petites boîtes de Pétri afin de déterminer le titre des banques. Le reste des bactéries est réparti sur de grandes boîtes de Pétri qui seront utilisées au tour suivant. Ajoutons que des bactéries sont également infectées avec des phages provenant du stock purifié et utilisé pour le panning de manière à pouvoir établir, grâce à des dilutions sériées de ces bactéries, le titre du stock utilisé dans chaque panning. Ce titre doit être compris entre 10^{12} et 10^{14} pfu/ml.

La difficulté, au cours de cette deuxième journée, est de faire coïncider les diverses opérations : la fin de la saturation des micropuits d'une part, avec la fin de la procédure de préparation des phages d'autre part. Il faut également que les bactéries TG1 soient en phase de croissance exponentielle au moment où les phages élués sont prêts à être utilisés pour les infections. Enfin, il faut avoir préparé du milieu solide pour pouvoir étaler les bactéries infectées par les phages positifs, négatifs et les phages provenant du stock. Tout cela sans parler de la préparation extemporanée de triéthylamine ...

Le troisième jour, les colonies provenant des bactéries infectées par les phages positifs, les phages contrôles ou le stock de phages sont comptées de manière à pouvoir estimer le titre de ces trois banques. Les bactéries correspondant à la banque positive sont récoltées et des stocks sont effectués en vue d'une conservation à -80°C . Une partie de ces stocks servira à l'ensemencement de milieu de culture de manière à démarrer un nouveau cycle de panning.

III.a. Procédures utilisées

Nous allons, dans la suite de ce travail, présenter les différentes procédures de panning effectuées en vue de l'isolement de phages recombinants reconnaissant spécifiquement du RGI. Pour chaque procédure, nous décrirons les résultats obtenus en matière de sélection d'affinité, d'ELISA polyclonal et d'analyse des inserts des clones présents dans les banques.

La littérature considère généralement qu'un enrichissement suffisant en phages se liant spécifiquement à l'antigène peut être atteint après 3 à 4 cycles de panning. Cet enrichissement est évalué à chaque cycle, par titration du nombre de phages élués, préalablement liés à l'antigène cible. Une augmentation du nombre relatif de phages élués à chaque cycle est habituellement perçue comme un signe d'enrichissement en phages exprimant des scFv spécifiques. En général, le facteur d'enrichissement obtenu durant les pannings varie de 20 à 1000 par cycle et peut même, lorsque l'anticorps a une affinité élevée, atteindre une valeur de 10^5 par cycle (de Haard *et al.*, 1998). Cependant, il n'existe aucun consensus dans la littérature qui permette de déterminer si oui ou non les valeurs d'enrichissement observées sont significatives.

Le succès d'un enrichissement peut être contrôlé par un ELISA polyclonal dans lequel une aliquote de chaque banque de phage obtenue à chaque cycle de panning est incubée avec l'antigène cible immobilisé dans un puits d'une boîte de microtitration. Cette opération permet d'évaluer rapidement la proportion de phages porteurs de récepteurs spécifiques dans le mélange de phages qui constitue la banque. Si le signal observé est jugé significatif, des clones individuels sont alors analysés en ELISA monoclonal.

Une vérification par PCR de la taille des inserts contenus dans les clones des banques dérivées des différents cycles de panning permet également de contrôler le fonctionnement de la procédure de sélection : quand elle se passe bien, une forte proportion de clones de la population totale contient des gènes scFv complets.

C'est sur base de ces différents critères que nous avons décidé de poursuivre ou d'abandonner ces procédures de sélection.

III b. Réalisation du panning A

III.b.1 La sélection d'affinité (alternance caséine, BSA, PdL, caséine)

Nous avons au cours de ce premier panning réalisé 4 cycles de sélection par affinité (Figure 19). Nous avons choisi de changer de solution de saturation à chaque cycle afin de réduire les risques d'amplification de phages aspécifiques qui reconnaîtraient plutôt les composants de la solution de saturation que le RGI. Trois solutions qui ont déjà apporté des résultats concluants dans d'autres études (Liners et Van Cutsem, soumis ; Chowdhury *et al.*, 1997 ; Okamoto *et al.*, 1997), ont été utilisées : une solution d'hydrolysate de caséine (caséine) 1% en PBS a été employée pendant les premier et quatrième cycles, de l'albumine bovine (BSA) 3% en PBS a servi au cours du second cycle et de la poudre de lait (PdL) 1% en PBS a été utilisée au troisième cycle.

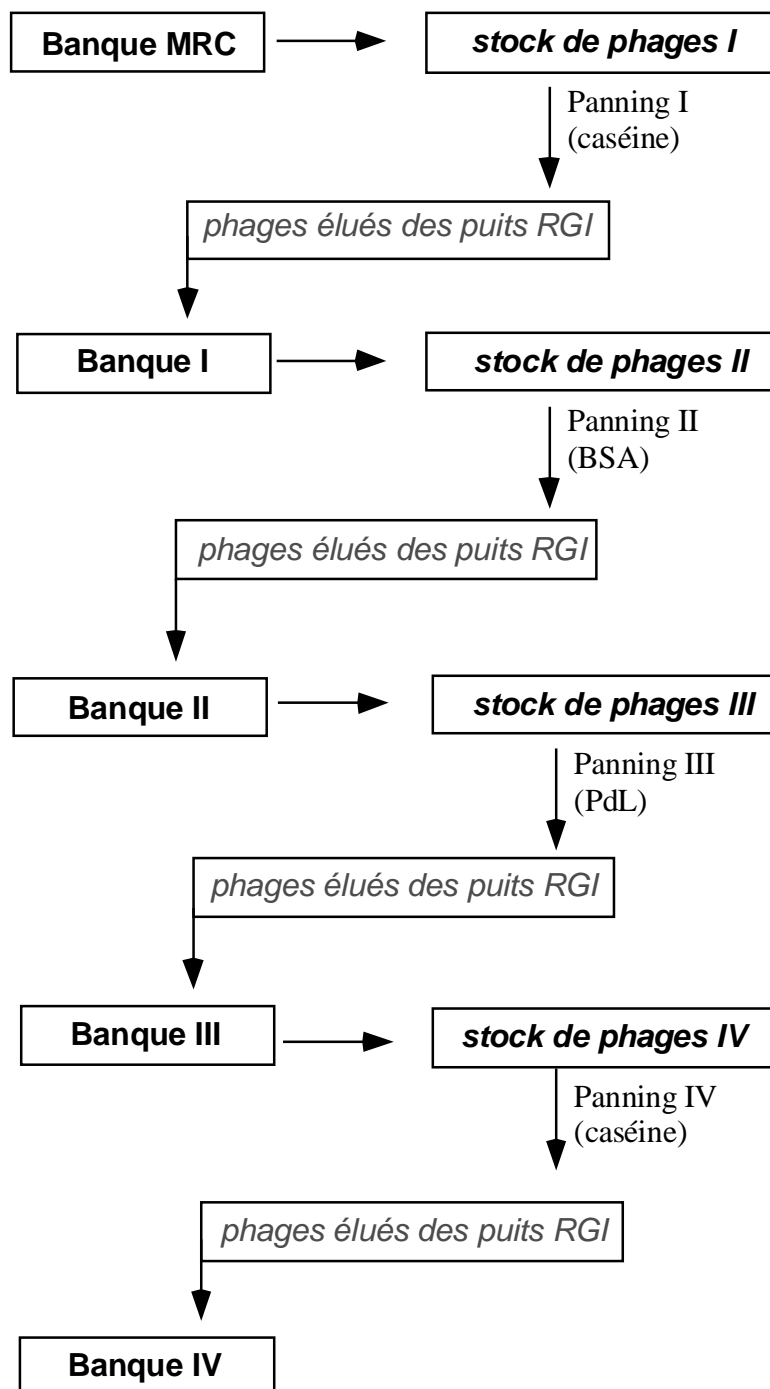


Figure 19 : Schéma de la procédure suivie au panning A.

Les résultats de ce panning sont représentés en Figure 20A et 20B. Dans la figure 20A, nous observons une augmentation progressive du nombre de phages positifs (élués à partir des puits recouverts avec le RGI) du premier au troisième cycle de panning, suivie d'une forte augmentation au quatrième cycle. Cette tendance est semblable pour les phages négatifs (élués à partir des puits recouverts avec les protéines de saturation) dont le nombre supplante cependant celui des phages positifs au quatrième tour. De même, lorsque nous comparons l'évolution de la proportion de ces deux populations de phages par rapport à la population totale de phages introduits dans chaque panning (Fig 20B), la population de phages négatifs qui, aux deuxième et troisième cycles, était inférieure à la population de phages positifs, s'est accrue de manière plus importante (facteur 1,33) que cette population de phages positifs au quatrième cycle.

Vu le fort enrichissement en phages non-spécifiques observé au quatrième tour, nous avons estimé qu'il n'était ni nécessaire de récolter la banque issue de ce panning, ni utile d'entreprendre un cycle supplémentaire, le risque d'amplifier une banque aspécifique étant particulièrement élevé. Nous avons plutôt décidé de réaliser un ELISA polyclonal qui nous livrerait une information aussi bien sur la capacité à reconnaître le RGI des populations de phages utilisées lors des différents tours de panning, que sur la stringence des solutions de saturation employées pour sélectionner les phages.

III.b.2 ELISA de phages polyclonaux

Dans cet ELISA (Figure 21), nous avons mesuré la capacité des quatre populations de phages (I, II, III et IV) utilisées dans les quatre cycles du panning A à reconnaître soit l'antigène cible (RGI), soit les agents de saturation utilisés au cours de la procédure de panning (caséine, BSA et PdL), et ceci sous chaque condition de saturation testée au cours du panning A (caséine 1%, BSA 3% et PdL 1%). Dans ce test, la reconnaissance d'un composant donné par les phages recombinants est révélée par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-M13 couplé à une peroxydase. La conversion, catalysée par l'enzyme, d'un substrat incolore en une solution colorée permet de quantifier les phages recombinants présents dans le puits. La fixation non spécifique des anticorps secondaires anti-M13-HRP a été vérifiée en les mettant directement en contact avec le RGI ou avec les agents de saturations testés. Un polysérum de souris anti-RGI (dilué 5000 x) dont nous disposions au laboratoire, nous a servi de contrôle positif, permettant de vérifier la présence de RGI dans le fond des micropuits.

Comme nous avons testé 72 conditions différentes sur les 96 puits disponibles de la microplaque, il ne nous a pas été possible d'obtenir de réplicat pour chacune des conditions testées. Les absorbances présentées en figure 21, 22 et 23 sont des valeurs desquelles les contrôles anticorps secondaires ont été soustraits (leur moyenne était pour la saturation à l'hydrolysate de caséine 1% de 0,076 ; pour la saturation à la BSA 3% de 0,112 ; et pour la saturation à la poudre de lait 1% de 0,071). Les anticorps secondaires ne se fixent donc pas de manière aspécifique dans les conditions du test. Les valeurs d'absorbance obtenues pour ces contrôles étaient du même ordre dans tous les ELISA effectués ultérieurement. La réponse significative du sérum anti-RGI (contrôle positif) observée sur le RGI nous a assuré de la présence effective de RGI dans les puits. Ce polysaccharide ne s'est donc pas décroché des micropuits au cours des lavages.

Dans ce test (Figure 21), les réponses les plus élevées sont obtenues lorsque l'agent de saturation utilisé est de la BSA. Avec cet agent, nous pouvons observer une forte réponse des stocks de phages I et II sur le RGI et sur la BSA. L'hydrolysate de caséine et la poudre de lait

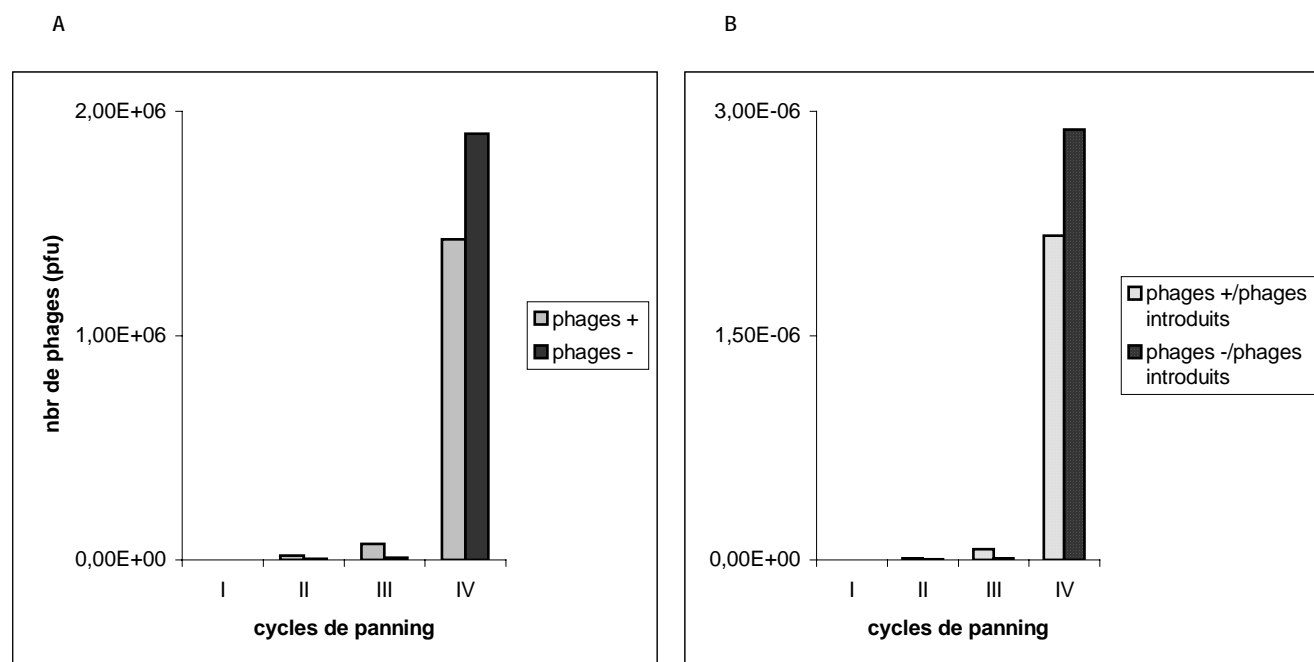


Figure 20 : A. Evolution du nombre de phages positifs (élués à partir des puits recouverts avec du RGI) et négatifs (élués à partir des puits recouverts avec les agents suivants : I : caséine ; II : BSA ; III : PdL ; IV : caséine) au cours des 4 cycles de sélection du panning A. B. Evolution de la proportion des phages positifs et négatifs par rapport à la quantité totale de phages introduits dans les 4 cycles de sélection du panning A.

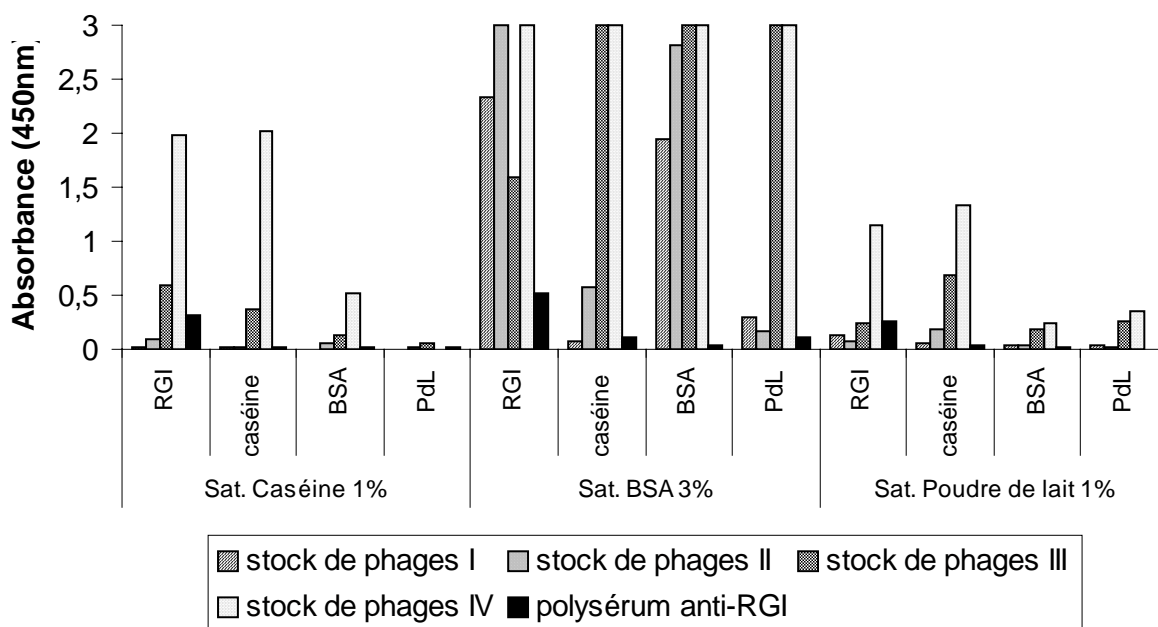


Figure 21 : ELISA des phages polyclonaux issus des 4 cycles du panning A. Influence des conditions de saturation (sat. Caséine 1%, sat. Poudre de lait 1%, sat. BSA 3%) sur la reconnaissance du RGI par les stocks de phages utilisés avant les tours I, II, III, IV du panning A. Comparaison avec la reconnaissance des protéines contrôles (caséine, BSA, PdL) par les mêmes stocks de phages.

sont par contre nettement moins reconnus par ces deux stocks de phages. Les stocks de phages III et IV montrent une réponse moyenne (phages III sur RGI) à maximale sur tous les antigènes testés dans les conditions de saturation en BSA. Les résultats obtenus dans des conditions de saturation en caséine (Figure 22) ou en poudre de lait (Figure 23) ont une allure très semblable : bien que l'on observe une augmentation du nombre de phages anti-RGI entre chaque stock de phages, toute réponse significative de chaque stock de phage sur le RGI s'accompagne en parallèle d'une réponse d'intensité pratiquement identique sur la caséine alors que la BSA et la PdL sont reconnues de façon plus faible.

Ces résultats ne nous ont pas permis de conclure à un enrichissement spécifique en phages anti-RGI au cours de cette procédure de panning. En effet, à chaque réponse significative d'un stock de phages donné sur le RGI correspond au minimum une réponse de ce même stock de phages sur une (ex. : Stock de phages IV en condition de saturation caséine, Fig. 22) ou sur plusieurs (ex. : Stock de phages IV en condition de saturation BSA, Fig. 21) protéines de saturation. Si nous ne pouvions pas exclure la présence de phages reconnaissant spécifiquement du RGI au sein des stocks de phages générés, ces phages spécifiques étaient par contre « noyés » dans un grand nombre d'autres phages capables de reconnaître soit la caséine, soit la BSA, soit la PdL, ce qui hypothéquait très fortement nos chances d'isoler un phage spécifique du RGI en ELISA monoclonal.

D'autre part, il apparaît clairement de nos résultats que la BSA, dont nous nous sommes servi comme agent saturant dans notre procédure de panning, n'est pas à utiliser dans le cadre de l'isolement de phages recombinants dirigés contre des polysaccharides tels que le RGI. Cette protéine semble plutôt favoriser l'enrichissement en phages non-spécifiques au cours de la sélection : en effet, le stock de phages III, provenant de la banque II (récoltée après le deuxième cycle de panning effectué en présence de BSA 3% pour l'étape de saturation, cfr. figure 19), montre une réponse sur caséine sensiblement égale ou supérieure à celle observée sur le RGI, et ce dans toutes les conditions de saturation testées. Par contre, la reconnaissance de la caséine par le stock de phages II, provenant de la banque I (récoltée après le premier cycle de panning effectué en présence de caséine 1% pour l'étape de saturation, cfr. figure 19) est pratiquement toujours inférieure à la réponse de ce même stock de phages sur le RGI. La BSA semble donc introduire une sorte de biais dans la procédure de sélection.

Toujours dans le but de contrôler le fonctionnement de notre procédure de panning, nous avons analysé les clones des banques 1, 2 et 3 par PCR.

III.b.3 Analyse des clones des banques I, II et III du panning A par PCR sur colonies

L'analyse PCR nous permet d'extrapoler dans la population de chaque banque le pourcentage de phages possédant un insert scFv complet (environ 750 pb). En effet, même si lors de la construction de leur banque, Griffith et ses collaborateurs ont réduit au minimum le nombre de phages possédant un insert incomplet [il s'agit le plus souvent de phages ne détenant qu'un fragment V_L (de Bruin *et al.*, 1999)], il ne leur a pas été possible d'éliminer tous ces phages. D'après eux, la banque contient moins de 1% de phages de ce type (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~plw/phageqa.html>) ce qui reste néanmoins un problème puisque ces phages, dont le génome est de taille plus réduite, possèdent la capacité de se répliquer beaucoup plus rapidement que les phages disposant d'un insert complet. Une analyse PCR peut donc nous offrir un aperçu de la qualité d'une banque générée après un cycle de panning.

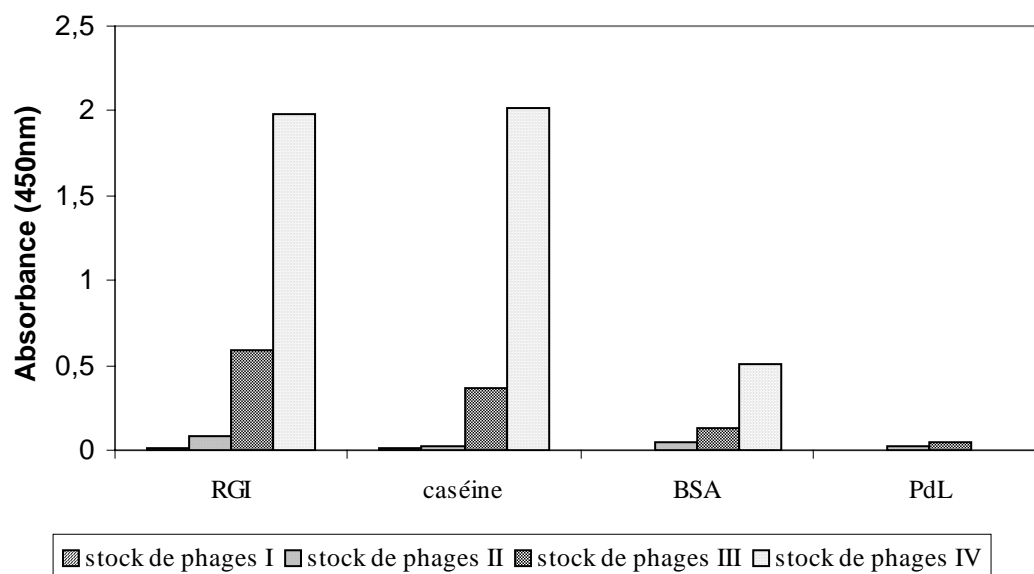


Figure 22 : Détail de la Figure 3. ELISA des stocks de phages polyclonaux du panning A, saturation à l'hydrolysate de caséine 1% en PBS.

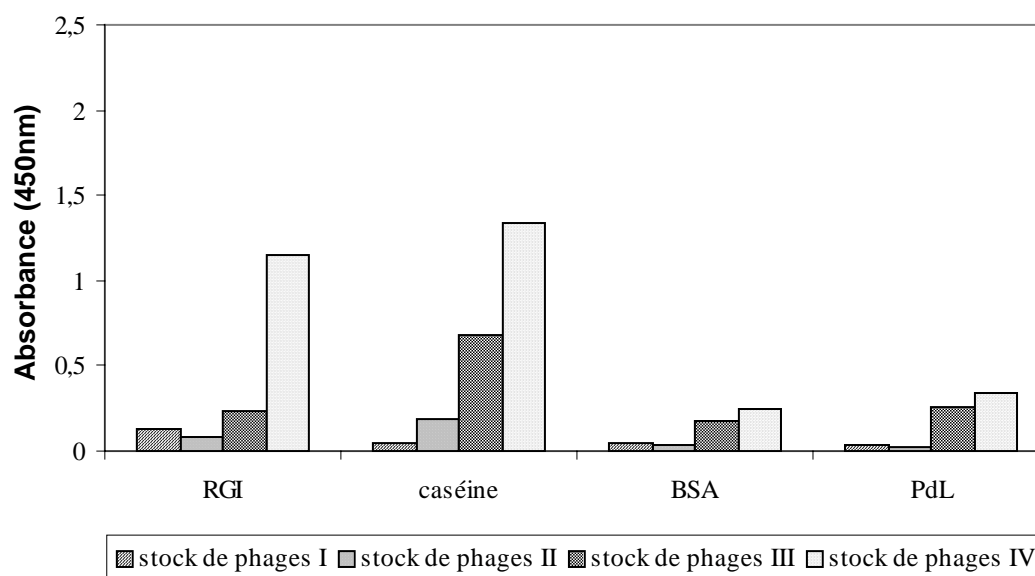


Figure 23 : Détail de la Figure 3. ELISA des stocks de phages polyclonaux du panning A, saturation avec de la poudre de lait 1% en PBS.

Des PCR ont été effectuées avec les amorces pHEN2 et LMB3 spécifiques du phagemide pHEN2 (Figure 15), de manière à amplifier l'insert cloné. Ces PCR ont été effectuées au départ de colonies prises au hasard : 20 pour la banque 1 et 10 dans le cas des banques 2 et 3. La figure 24 présente un résultat type d'analyse d'inserts par PCR sur colonies. Trois amplicons de taille différente peuvent être observés : un de ~950 pb, correspondant à la présence d'un insert scFv complet (750 pb additionné de ~200 pb du vecteur) ; un de ~500 pb correspondant à un insert scFv incomplet (300 pb de V_L additionné de ~200 pb du vecteur) et un de ~200 pb correspondant au vecteur sans insert. Dans certains cas, aucune amplification n'a été observée, ce qui a été attribué à un artefact de manipulation dû à l'introduction d'une trop grande quantité de bactéries dans le mix PCR.

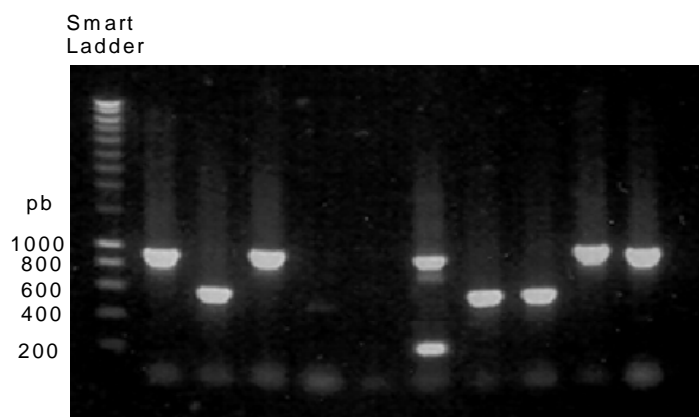


Figure 24 : Analyse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenus par PCR en utilisant les amorces spécifiques du vecteur pHEN2 au départ de clones bactériens prélevés au hasard dans la banque I. En général, quatre situations sont observées : soit le clone possède un scFv complet (environ 750 pb) et on observe sur le gel une bande à 950 pb correspondant à l'insert et les séquences du vecteur qui le bordent ; soit l'insert est incomplet et seul un fragment de scFv est présent dans le vecteur il s'agit le plus souvent des V_L (amplicon d'environ 550 pb) ; soit le clone ne possède pas d'insert et un fragment de 200 pb correspondant à la séquence du vecteur amplifiée par les deux amorces est visible ; soit aucune amplification n'est observée, ce qui a été attribué à un artefact de manipulation dû à l'introduction d'une trop grande quantité de bactéries dans le mix PCR.

La figure 25 présente une extrapolation de ces résultats PCR, où la proportion de clones présentant des inserts complets ou incomplets dans les banques I, II et III est exprimée en pourcentage. Ajoutons que nous avons regroupé les clones n'ayant pas donné lieu à une amplification et ceux contenant du vecteur sans insert dans une seule rubrique notée « pas d'insert ». Si des inserts de taille correcte correspondant à des scFv complets sont présents dans 45% des clones de la banque I, ils sont par contre entièrement absents des clones constituant les banques II et III. Parallèlement, le pourcentage de clones présentant des inserts de taille inférieure à 750 pb augmente au cours des cycles de panning, passant de 35 à 40 puis à 90 % dans les banques I, II et III respectivement. L'absence de clones pourvus d'insert complet dans les banques II et III hypothéquait une fois de plus nos chances de pouvoir utiliser ces dernières pour l'isolement de phages monoclonaux spécifiques du RGI et présentant des inserts correspondant à des scFv complets.

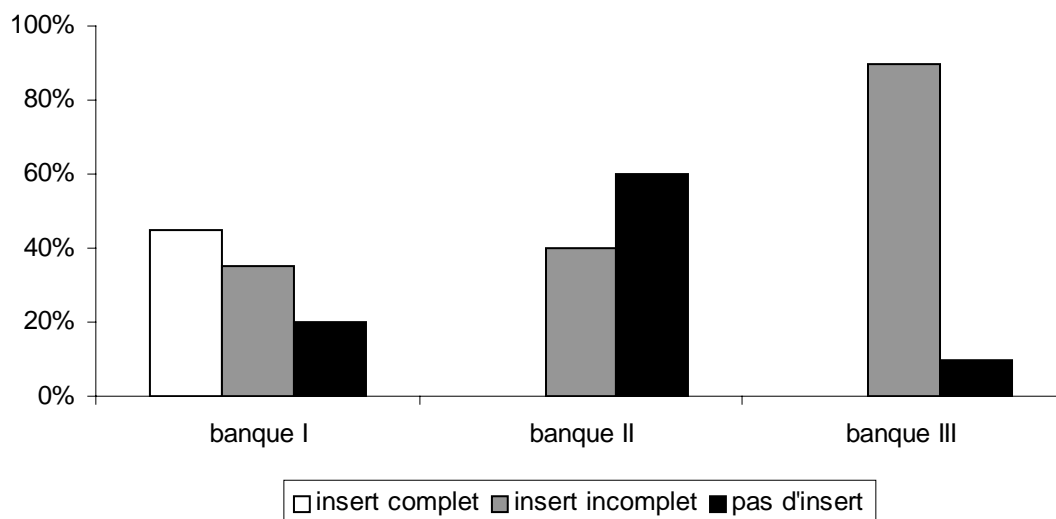


Figure 25 : Evolution de la taille des inserts présents dans des clones prélevés, au hasard, au sein des banques provenant des pannings I, II, III du panning A. Les colonnes « pas d'insert » désignent les clones qui ne possèdent pas d'insert et/ou n'ont pas été amplifiés.

III.b.4 Conclusion

De ce premier panning et des contrôles ELISA et PCR que nous avons effectués, nous pouvons conclure que la BSA est un agent de saturation à proscrire dans le cadre de pannings visant à l'isolement de phages recombinants spécifiques de polysaccharides tels que le RGI. En effet, bien qu'elle soit recommandée dans le cadre du protocole d'utilisation de la banque fournie par le MRC, son utilisation dans notre procédure de panning a été immédiatement suivie d'un enrichissement des banques en phages non spécifiques se fixant sur les protéines de saturation telles que la caséine et/ou la BSA et dépourvus, comme l'analyse PCR nous l'a dévoilé, d'insert complet.

A la suite de cette procédure de panning, nous avons décidé d'en entreprendre une nouvelle au départ de la banque intermédiaire I produite au cours du panning A. Celle-ci possédait en effet 45% de clones présentant un insert de bonne taille et, de plus, dans l'ELISA polyclonal, la reconnaissance du RGI par le stock de phages II qui en dérive était supérieure à la réponse de ce stock sur les autres antigènes testés. Dans ce nouveau panning (panning B), nous avons continué d'alterner les solutions de saturation, en utilisant de la poudre de lait et de la caséine, toujours dans le but de réduire les populations de phages capables de se fixer aux composants de ces solutions.

III.c. Réalisation du panning B

III.c.1 La sélection d'affinité (alternance caséine et PdL)

Trois cycles d'enrichissement ont été effectués au cours de ce panning (Figure 26) où les solutions de saturation étaient, pour le premier et le dernier cycle, de l'hydrolysate de caséine (caséine) 1% en PBS et, pour le second cycle, de la poudre de lait (PdL) 1% en PBS. Tout au long des trois cycles, le nombre de phages positifs (élus au départ des puits recouverts avec le RGI) et négatifs (élus au départ des puits recouverts avec les protéines de saturation) augmente (Figure 27A) : au départ moins abondants, les phages positifs sont 1,22 fois plus nombreux que les phages négatifs au second tour et cet écart s'accroît au troisième cycle où leur nombre est 1,69 fois plus élevé que celui des phages négatifs. De même (Figure 27B), nous pouvons observer un enrichissement des deux populations de phages par rapport à la population totale de phages introduits dans chaque panning qui se manifeste particulièrement entre le deuxième et le troisième cycle (de l'ordre de 10^4). Le rapport du nombre de phages positifs sur le nombre de phages introduits est 1,60 fois supérieur au rapport phages négatifs/phages introduits.

Au vu de ces résultats, il nous a semblé que les banques avaient été enrichies en phages positifs au cours des cycles du panning B, même si cet enrichissement restait faible comparé aux résultats obtenus dans le cas du panning A. Ainsi, le rapport du nombre de phages positifs sur le nombre de phages négatifs passe de 0,59 à 7 entre le premier et le troisième cycle du panning A, alors que dans le cas du panning B, il passe de 0,59 à 1,69. La population de phages négatifs étant également fortement enrichie au troisième cycle, nous avons préféré réaliser un ELISA polyclonal avant d'entamer un éventuel quatrième cycle de panning, ceci de manière à nous assurer également de la spécificité de l'enrichissement en phages positifs.

III.c.2 ELISA de phages polyclonaux

Cet ELISA (Figure 28) a une configuration tout à fait semblable à celle décrite pour le test ELISA polyclonal du panning A (voir III.b.2), exception faite de la BSA qui est une BSA prévue plus particulièrement pour les tests ELISA (Sigma, A7030), que nous avons préféré utiliser en ELISA avant de l'intégrer dans un éventuel panning. De même, les contrôles positifs et négatifs sont identiques à ceux utilisés pour l'ELISA polyclonal du panning A (voir I.2). Trois stocks de phages ont été testés : le stock de phages I qui a été préparé à partir de la banque du MRC au cours du panning A et les stocks de phages II et III qui proviennent respectivement des banques I et II du panning B (Figure 26).

Comme dans le cas du test ELISA polyclonal précédent (voir III.b.2), le polysérum anti-RGI reconnaît le RGI de manière significative dans toutes les conditions testées, sans bruit de fond sur les protéines contrôles (Figure 28).

De même, les réponses des phages les plus élevées ont été obtenues lorsque l'agent de saturation utilisé était la BSA. Dans ces conditions de saturation, nous remarquons qu'aucun stock de phages ne présente une réponse

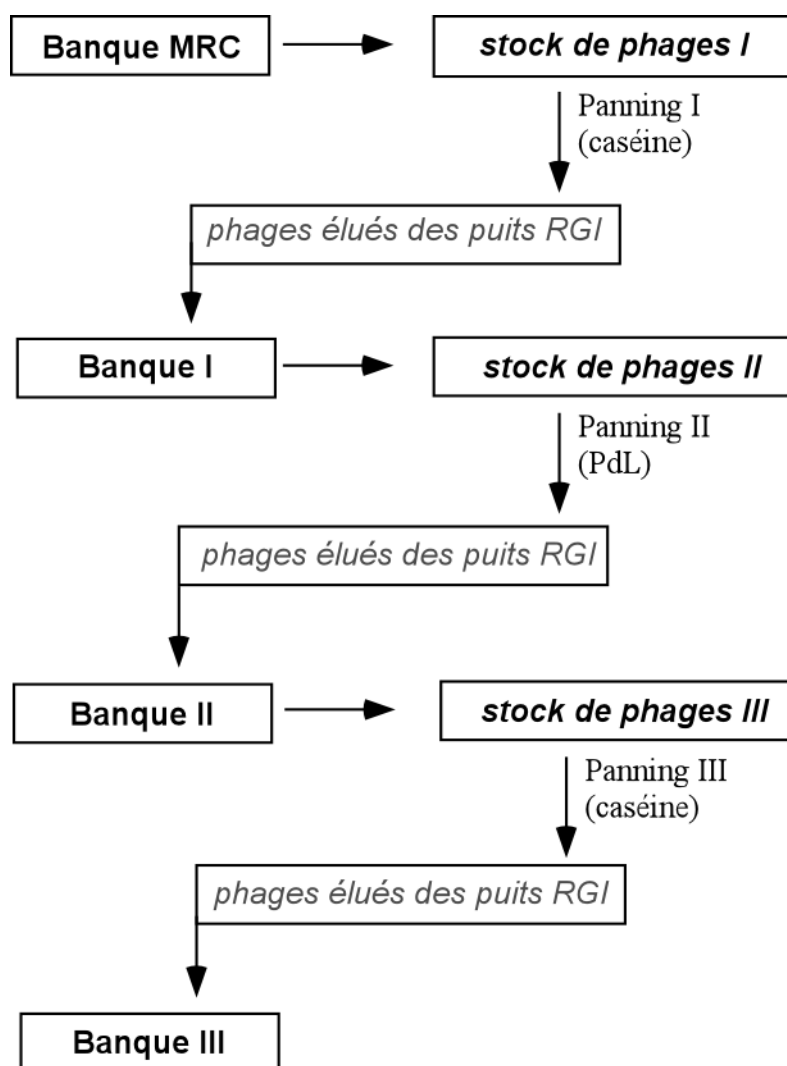


Figure 26 : Schéma de la procédure suivie au panning B.

contre le RGI supérieure à la reconnaissance des protéines contrôles. Si la reconnaissance du RGI augmente du stock de phages I au stock de phages III, il en est de même pour la détection des protéines contrôles par ces mêmes stocks qui, par ailleurs, présentent tous une réponse plus importante contre la caséine, atteignant dans le cas du stock de phages III, une réponse deux fois plus élevée que celle observée sur le RGI.

Une saturation des puits avec de l'hydrolysate de caséine (Figures 28 et 29) permet d'obtenir des réponses d'allure semblable mais d'intensité plus faible à celles observées lorsque l'agent saturant est la BSA. Par contre, l'utilisation de la poudre de lait comme protéine de saturation (Figures 28 et 30) ne permet pas de mettre en évidence une réponse significative des stocks de phages, et plus particulièrement du stock de phages III, contre le RGI. L'intensité de la reconnaissance de la caséine et de la poudre de lait par ce même stock est également nettement plus faible que dans les deux autres conditions de saturation. Ajoutons que sous les conditions de saturation à la caséine et à la poudre de lait, la BSA n'est pas reconnue de manière significative par les stocks de phages testés.

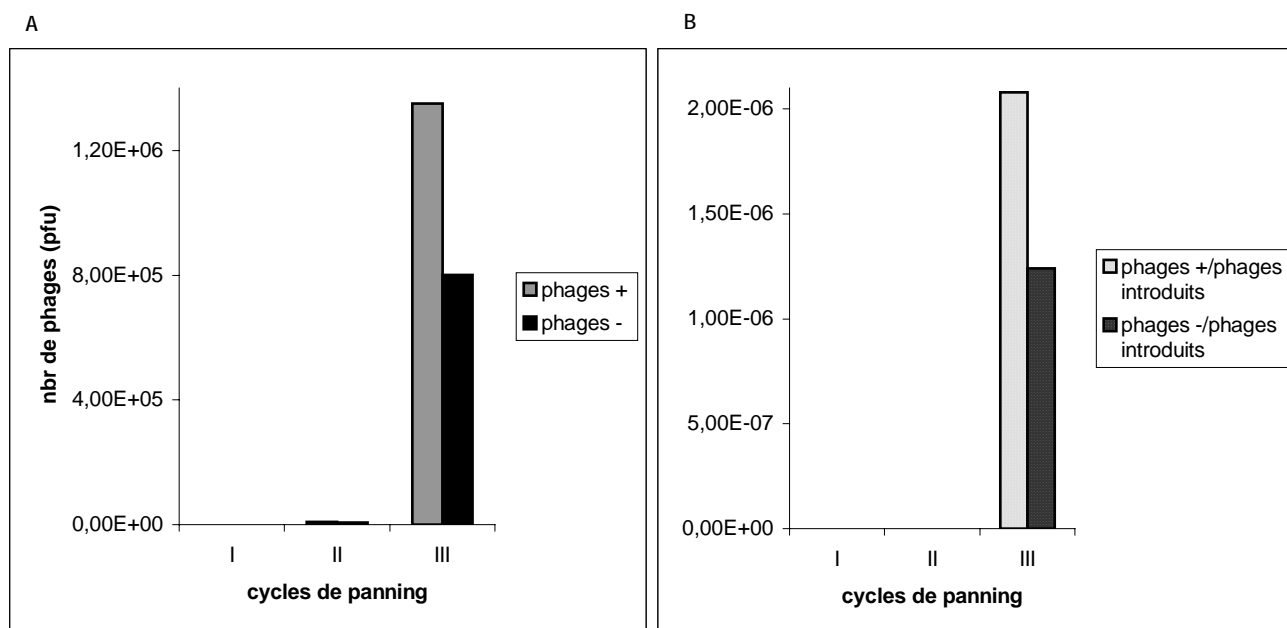


Figure 27 : A. Evolution du nombre de phages positifs (élués à partir des puits recouverts avec du RGI) et négatifs (élués à partir des puits recouverts avec les agents suivants : I : caséine ; II : PdL ; III : caséine) au cours des 3 cycles de sélection du panning B. B. Evolution de la proportion des phages positifs et négatifs par rapport à la quantité totale de phages introduits dans les 3 cycles de sélection du panning B.

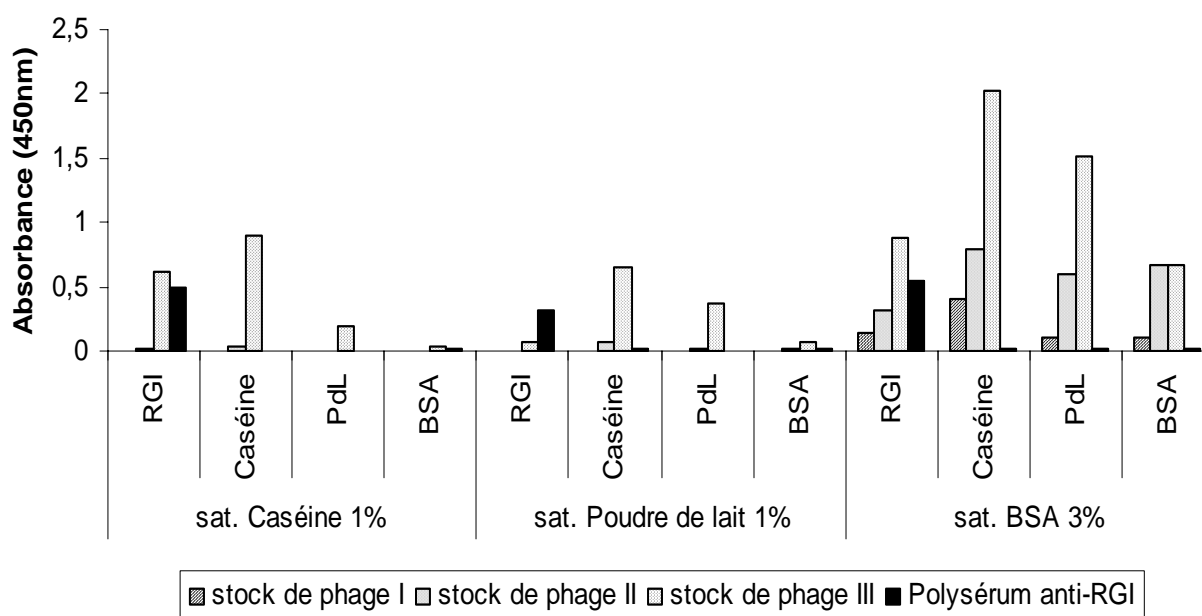


Figure 28 : ELISA des phages polyclonaux issus des 3 cycles du panning B. Influence des conditions de saturation (sat. Caséine 1%, sat. Poudre de lait 1%, sat. BSA 3%) sur la reconnaissance du RGI par les stocks de phages utilisés avant les cycles I, II, III du panning B. Comparaison avec la reconnaissance des protéines contrôles (caséine, BSA, PdL) par les mêmes stocks de phages. Remarque : le stock de phage I utilisé ici est le même que le stock de phage I du panning A.

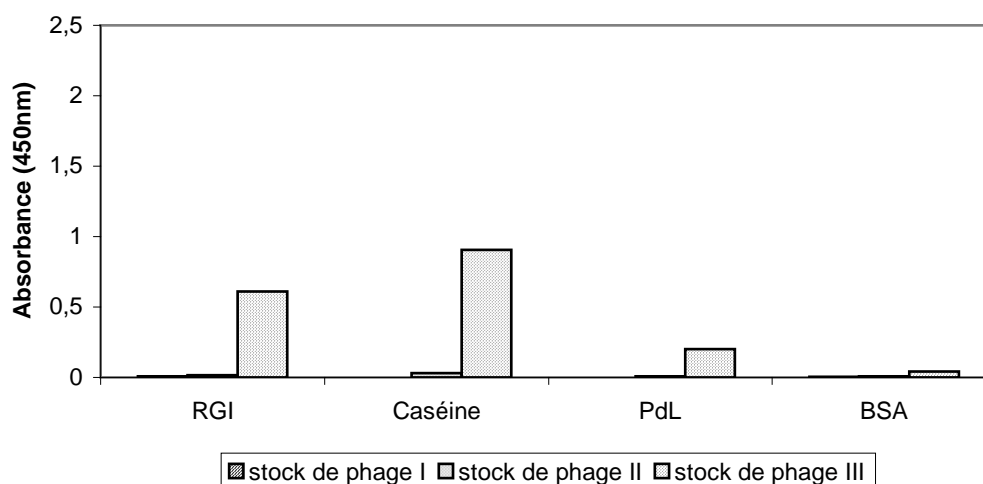


Figure 29 : Détail de la Figure 10. ELISA des stocks de phages polyclonaux du panning B, saturation à l'hydrolysate de caséine 1% en PBS.

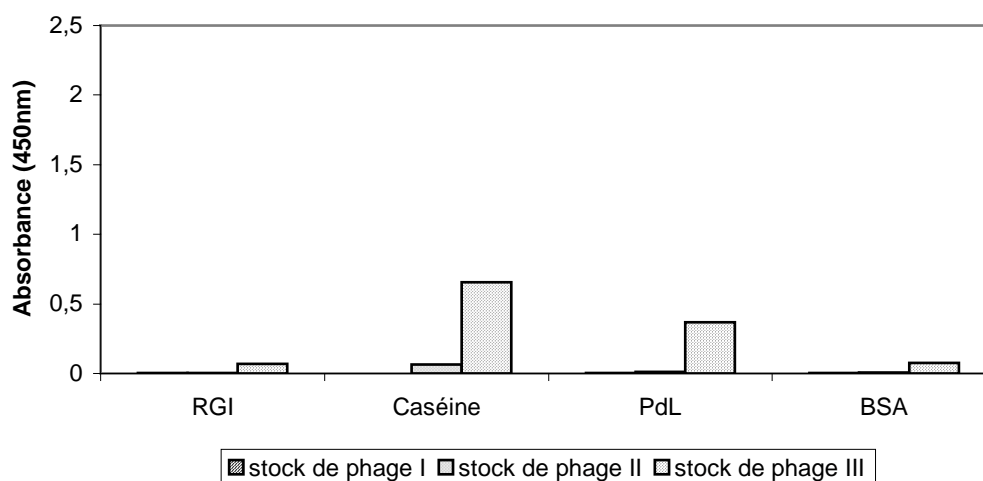


Figure 30 : Détail de la Figure 10. ELISA des stocks de phages polyclonaux du panning B, saturation avec de la poudre de lait 1% en PBS.

Comme précédemment, ces résultats ne nous ont pas permis de conclure à un enrichissement spécifique en phages anti-RGI au cours de cette procédure de panning. En effet, toutes les réponses des stocks de phages sur le RGI sont systématiquement d'intensités inférieures à celles observées sur la caséine. Le stock de phages III semble donc être composé majoritairement de phages capables de reconnaître la caséine. Les phages recombinants se fixant spécifiquement au RGI y seraient présents en quantité nettement plus faible. Remarquons que les résultats obtenus avec la nouvelle BSA ne nous ont pas satisfaits : bien qu'elle donne lieu à des réactions de type « bruit de fond » moindres, les réponses non spécifiques sont encore trop élevées que pour justifier son utilisation dans une procédure de panning.

III.c.3 Analyse des clones des banques II et III du panning B par PCR sur colonies

Des PCR ont été effectuées avec les amorces pHEN2 et LMB3 (Figure 15) de manière à amplifier l'insert cloné dans le phagemide pHEN2 de 10 colonies prises au hasard dans les banques II et III du panning B. L'extrapolation de ces résultats PCR (Figure 31) indique que si 45% des clones de la banque I (idem banque I du panning A) sont pourvus d'un insert de bonne taille correspondant à un scFv complet, seuls 20% des clones de la banque II et 10% des clones de la banque III présentent ce même insert. Les clones contenant des inserts incomplets représentent respectivement 35, 30 et 20% des clones des banques I, II et III. Enfin, les clones dépourvus d'insert (c'est-à-dire n'ayant pas donné lieu à une amplification ou contenant du vecteur sans insert) constituent respectivement 20, 50 et 70% des clones des banques I, II et III. La faible proportion de clones pourvus d'insert complet dans les banques II et III hypothéquait une fois de plus nos chances de pouvoir utiliser ces dernières pour l'isolement de phages monoclonaux spécifiques du RGI, possédant des inserts de taille attendue.

III.c.4 Conclusion

Nous pouvons conclure à ce stade que cette deuxième procédure de panning n'a pas permis de résoudre les problèmes liés à l'enrichissement non spécifique des banques au cours des cycles. Les contrôles ELISA et PCR que nous avons réalisés mettent en évidence, au cours des cycles, la réponse supérieure des stocks de phages sur la caséine par rapport au RGI, ce qui va de pair avec un appauvrissement des banques en clones possédant des inserts de bonne taille. En conséquence, nous avons décidé d'arrêter cette deuxième procédure de panning et de redémarrer de nouveaux pannings à partir de la banque du MRC.

Etant donné que notre stratégie de changement des protéines de saturation à chaque cycle de la procédure de panning ne semblait pas résoudre le problème de l'enrichissement progressif des banques secondaires en phages non spécifiques de l'antigène cible (cfr. Procédures de pannings A et B), nous avons tenté de remédier à ce problème en envisageant trois autres possibilités. La première consistait à laver les puits non plus avec du PBS-Tween 0,1% mais avec du PBS-Tween 0,5% qui semble être le pourcentage maximal auquel cette solution puisse être utilisée dans cette application (Barbas *et al.*, 2001). La présence de détergent en plus grande quantité dans les tampons de lavage augmenterait leur stringence, permettant de décrocher une plus grande quantité de phages de faible affinité, fixés sur le RGI ou sur la protéine de saturation, ce qui favoriserait un enrichissement spécifique : seuls les phages ayant une bonne affinité pour le RGI seraient élus et auraient la possibilité d'être amplifiés dans les cycles ultérieurs.

La seconde possibilité était d'ajouter au protocole de panning deux étapes supplémentaires ayant pour but de soustraire les phages qui auraient tendance à se fixer aux protéines de saturation (Barbas *et al.*, 2001). Ainsi, les phages élus à partir des puits recouverts avec du RGI ne seraient pas utilisés directement pour l'infection de bactéries TG1. Ils seraient d'abord ré-incubés avec un mélange de protéines de saturation (1% d'hydrolysate de caséine, 3% de BSA et 1% de poudre de lait en PBS) pendant 30 minutes à température ambiante et ensuite centrifugés avant d'être mis en contact avec ces bactéries. Selon cette hypothèse, la liaison potentielle des phages à une protéine limiterait et/ou empêcherait ces derniers d'infecter des bactéries TG1 et dès lors, d'être amplifiés au cours des cycles de sélection.

Enfin, la troisième possibilité que nous avons envisagée consistait à remplacer les protéines de saturation utilisées dans les procédures de panning précédentes par une préparation de protéines de phages M13. En effet, si les phages sont capables de se fixer de manière non-spécifique sur des protéines telles que la BSA via le(s) scFv présent(s) à l'extrémité N-terminale d'une ou de plusieurs (maximum 5) de leurs protéines pIII, il est également tout à fait plausible qu'une partie de ces fixations non spécifiques soient dues à des interactions entre les 2700 protéines pVIII de ces mêmes phages et les protéines de saturation comme la BSA. En conséquence, si les puits étaient saturés avec ces mêmes protéines de phage (pIII et pVIII solubilisées), ces derniers n'auraient seulement la possibilité d'interagir avec l'antigène cible (le RGI) ou une protéine contrôle (la caséine) que par l'intermédiaire de leur(s) scFv.

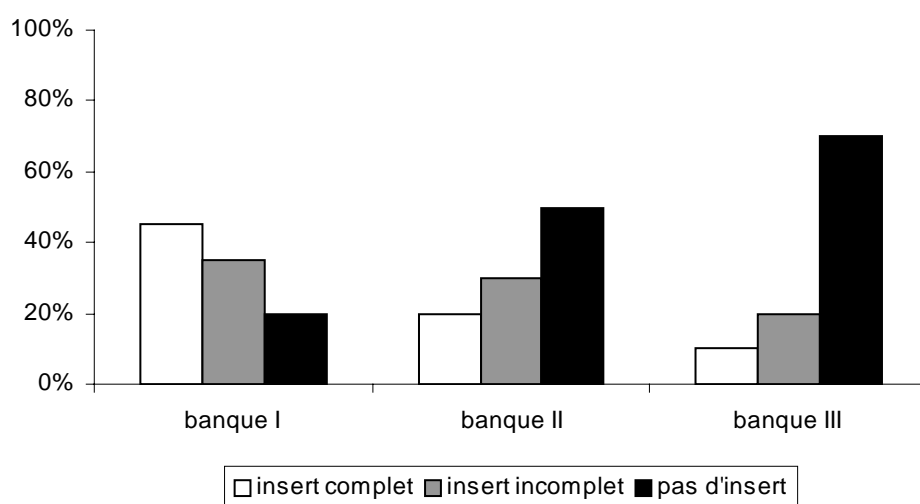


Figure 31 : Evolution de la taille des inserts présents dans des clones prélevés au hasard au sein des banques provenant des pannings I, II, III du panning B. Les colonnes « pas d'insert » désignent les clones qui ne possèdent pas d'insert et/ou n'ont pas été amplifiés.

III.d. Réalisation du panning C

III.d 1 La sélection d'affinité (soustraction des phages non spécifiques)

Dans cette troisième procédure de panning, nous avons choisi de tester les deux premiers paramètres cités ci-dessus, à savoir (a) utilisation de PBS-Tween 0,5 % et (b) soustraction des phages non spécifiques par ré-incubation, dans un mélange protéique, des phages élués à partir des puits recouverts avec du RGI. L'hydrolysate de caséine 1% en PBS a servi de solution de saturation au cours des deux cycles qui ont été réalisés (Figure 32).

Contrairement à ce qui avait été observé dans le cas du premier cycle du panning A, le nombre de phages positifs élués à partir de puits recouverts de RGI lors du premier cycle de ce panning C est particulièrement élevé ($1,4 \cdot 10^6$) (Figure 33A). Les phages négatifs, élués à partir de puits recouverts de caséine sont également très nombreux ($1,2 \cdot 10^6$). Une chute très importante du nombre de phages positifs et négatifs élués se produit lors du deuxième cycle, les phages négatifs restant à ce stade deux fois plus nombreux. De même, si au premier cycle le rapport du nombre de phages positifs sur le nombre de phages introduits est plus important que le rapport phages négatifs/phages introduits (Figure 33B), la population positive diminue d'un facteur 10 au second tour, alors que la non spécifique ne diminue que de 7 fois.

Il est fréquent d'observer une diminution du nombre de phages élués du premier cycle au deuxième (Liniers et Van Cutsem, soumis). Elle est à mettre en rapport avec le nombre de lavages, qui double au deuxième cycle, et qui permet de ne garder accrochés à leur antigène cible que les phages ayant une bonne affinité pour ce dernier. En général, cette chute du

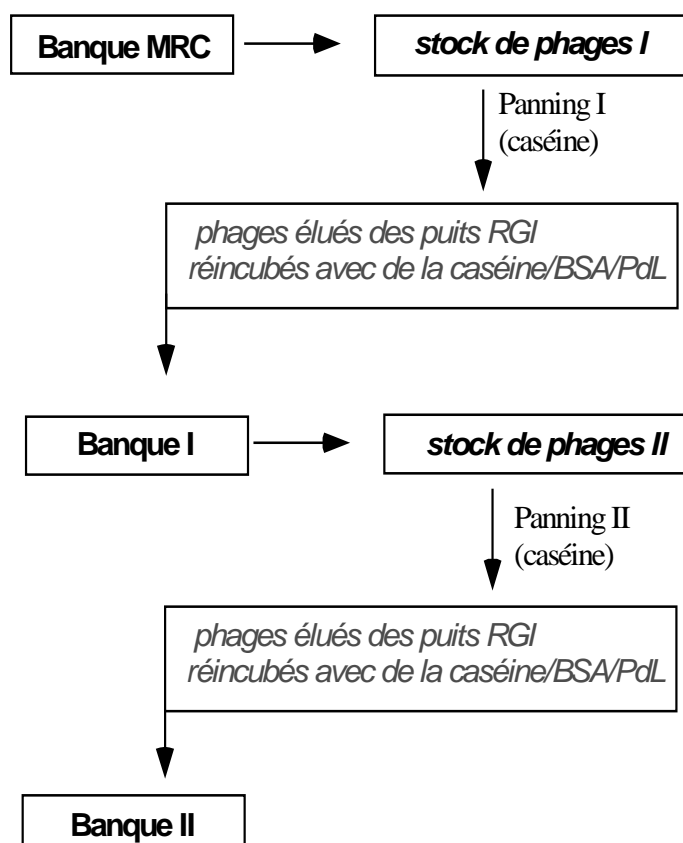


Figure 32 : Schéma de la procédure suivie au panning C.

nombre de phages est souvent suivie d'un enrichissement spécifique. Cependant, vu la présence en quantité deux fois plus importante des phages négatifs par rapport aux phages positifs au second cycle, nous avons préféré contrôler le fonctionnement du panning C par un test ELISA polyclonal et une analyse PCR des inserts contenus dans les clones constituant les banques intermédiaires.

III.d.2 ELISA de phages polyclonaux

Dans cet ELISA, nous avons mesuré la réponse des deux stocks de phages (I et II) utilisés dans les deux cycles du panning C sur le RGI d'une part, et sur des protéines contrôle (caséine, BSA et PdL) d'autre part, et ceci sous deux conditions de saturation : hydrolysate de caséine 1% et poudre de lait 1%. Les contrôles anticorps secondaires ont été effectués comme précédemment. Par manque de polysérum, nous n'avons pas pu intégrer de contrôle positif dans ce test. Toutes les mesures ont été réalisées en double.

La réponse des contrôles anticorps secondaires était, dans ce test, plus importante que dans les ELISA précédents (moyennes de 0,4 et de 0,5 en saturation par de l'hydrolysate de caséine et de la poudre de lait, respectivement). Comme précédemment, ces valeurs ont été soustraites des valeurs obtenues en présence des anticorps primaires (phages) ce qui explique, du moins en partie, les faibles réponses généralement observées dans cet ELISA (Figure 34).

Les réponses des phages les plus élevées ont été obtenues lorsque l'agent de saturation utilisé était la poudre de lait, les réponses observées en utilisant l'hydrolysate de caséine étant trop faibles pour pouvoir en tirer des conclusions. Sous la condition de saturation à la poudre de lait, seul le stock de phages II présente une réponse significative contre le RGI, supérieure à la reconnaissance de la BSA et de la poudre de lait. Par contre, ce même stock de phages reconnaît la caséine avec une intensité tout à fait semblable, même légèrement supérieure.

Si cet ELISA semblait indiquer qu'une sélection de phages anti-RGI avait eu lieu au cours de ce panning, il montrait également, comme dans tous les pannings précédents, qu'une population de phages aspécifiques avait également été sélectionnée.

III.d.3 Analyse des clones des banques I et II du panning C par PCR sur colonies

Les inserts clonés dans le phagemide pHEN2 de 19 et 10 colonies prises au hasard respectivement dans les banques I et II du panning C ont été amplifiés par PCR avec les amorces pHEN2 et LMB3 spécifiques du vecteur. L'extrapolation de ces résultats PCR (Figure 35) indique que si 53% des clones de la banque I contiennent un insert de bonne taille correspondant à un scFv complet, seuls 20% des clones de la banque II présentent encore ce même insert. Par contre, les clones pourvus d'inserts incomplets constituent 21% des clones de la banque I et 70% des clones de la banque II. Enfin, les clones dépourvus d'insert (c'est-à-dire n'ayant pas donné lieu à une amplification ou contenant du vecteur sans insert) représentent respectivement 26 et 30 % des clones des banques I et II.

Avec une proportion aussi élevée de clones possédant des inserts incomplets, nos chances de pouvoir utiliser la banque II de ce panning C pour l'isolement de phages

monoclonaux spécifiques du RGI, possédant des inserts de taille attendue, nous ont paru très réduites.

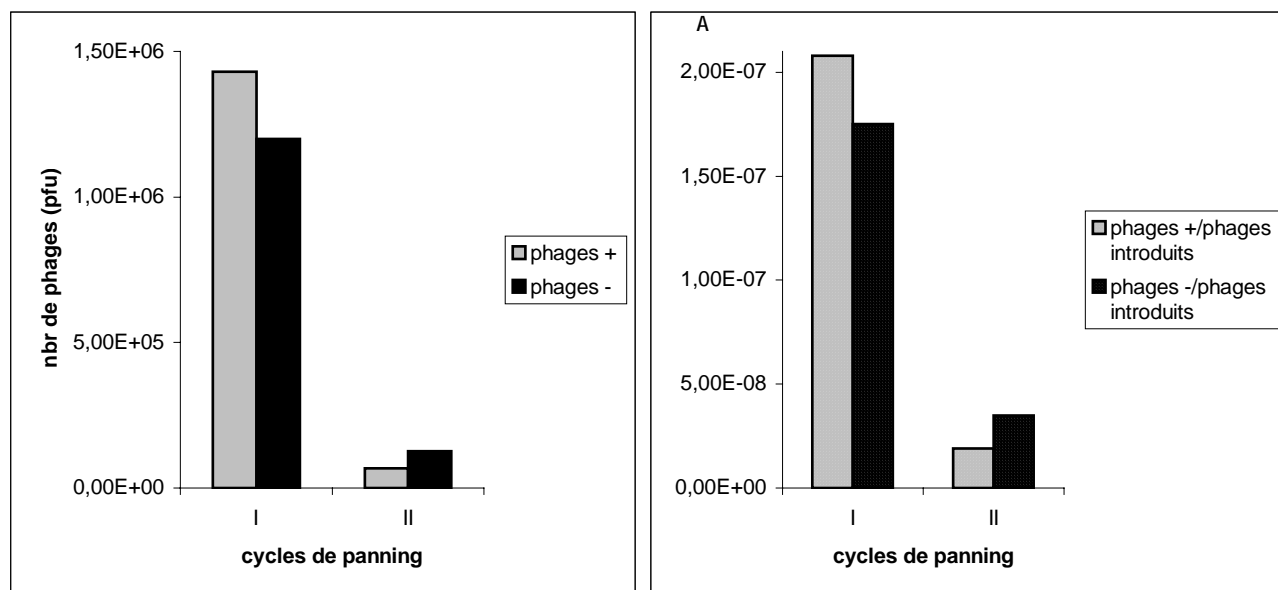


Figure 33 : A. Evolution du nombre de phages positifs (élués à partir des puits recouverts avec du RGI) et négatifs (élués à partir des puits recouverts avec l'hydrolysate de caséine au cours des 2 cycles de sélection du panning C. B. Evolution de la proportion des phages positifs et négatifs par rapport à la quantité totale de phages introduits dans les 2 cycles de sélection du panning C.

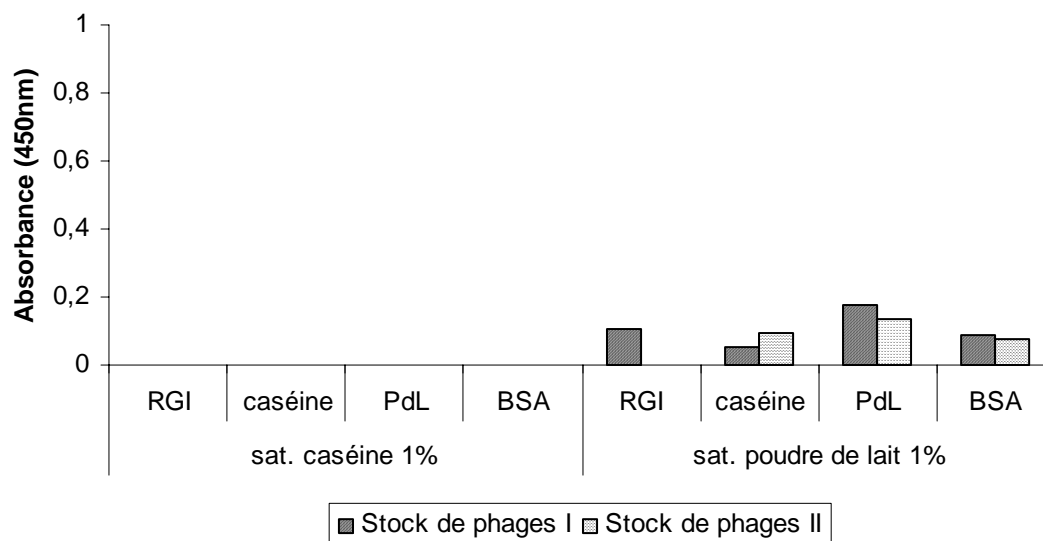


Figure 34 : ELISA des phages polyclonaux issus des 2 cycles du panning C. Influence des conditions de saturation (sat. caséine 1%, sat. Poudre de lait 1%) sur la reconnaissance du RGI par les stocks de phages utilisés avant les tours I, II, III du panning C. Comparaison avec la reconnaissance des protéines contrôles (caséine, BSA, PdL) par les mêmes stocks de phages.

III.d.4. Conclusions

L'absence d'enrichissement spécifique observée au cours de ce panning, ajoutée (a) à la réponse légèrement supérieure du stock de phages II sur la caséine par rapport au RGI en ELISA et surtout (b) à la forte proportion de clones possédant des inserts incomplets dans cette banque 2, ont motivé notre décision de ne pas poursuivre cette procédure de panning C en effectuant un troisième cycle au départ de la banque II. En conséquence, nous avons décidé d'entamer une nouvelle procédure de panning au départ de la banque intermédiaire I de ce panning C qui possédait 53% de clones présentant un insert de bonne taille et en utilisant des protéines de phages M13 comme agents de saturation. L'ajout d'une étape de pré-incubation des phages élués ne semblant pas être particulièrement efficace, nous l'avons éliminée de cette nouvelle procédure de panning.

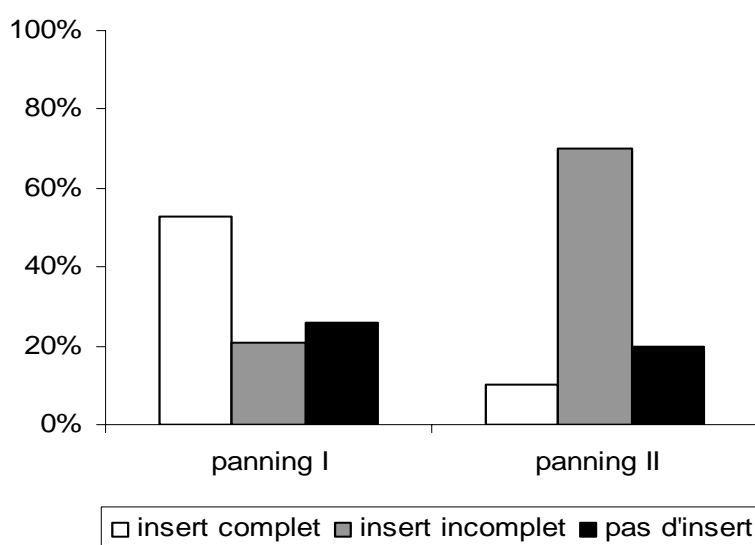


Figure 35 : Evolution de la taille des inserts présents dans des clones prélevé au hasard au sein des banques provenant des pannings I et II du panning C. Les colonnes « pas d'insert » désignent les clones qui ne possèdent pas d'insert et/ou n'ont pas été amplifiés.

III.e. Réalisation du panning D

III.e.1 Préparation de protéines de phages M13

Des phages helper ont été mis en culture, purifiés par précipitation au PEG-NaCl et leurs protéines extraites en utilisant un tampon contenant du SDS, du DTT et du β -mercaptoéthanol. Le fonctionnement du processus d'extraction a été vérifié par analyse d'une aliquote d'extrait protéique M13 (EP M13) en gel SDS-PAGE 8% (Figure 36). La bande visible aux environs de 50 kDa correspond probablement aux protéines pIII dont le poids moléculaire est de 42,5 kDa (Sidhu, 2001). Les autres protéines telles que les pVIII (5,2 KDa) ayant un poids moléculaire bien inférieur n'apparaissent pas sur ce gel. Les protéines contenues dans cet extrait protéique ont été dosées par test Bradford : l'EP M13 dilué 10x a une concentration de 0,53 mg/ml.

Nous avons voulu d'une part établir les conditions d'utilisation de cet EPM13 en tant qu'agent de saturation pour les pannings et d'autre part, nous assurer que cet extrait protéique préparé dans du tampon contenant notamment du SDS n'altérerait pas la viabilité des phages. Ces vérifications ont été effectuées en ELISA.

III.e.2 Test de viabilité des phages dilués dans l'EP M13 et effet de la saturation en EP M13 sur la sélection des phages

Comme nous souhaitions tester l'influence de la concentration d'EP M13 en tant qu'agent de saturation dans le cadre d'un panning, nous avons réalisé cette expérience dans les mêmes conditions que si nous réalisions un panning. Pour cela, nous avons recouvert des puits avec soit de l'hydrolysate de caséine 1% (servant ici d'antigène cible), soit des protéines M13 diluées 10x (servant ici de protéine contrôle). Ces puits ont été lavés une fois en PBS et ensuite saturés avec de l'EP M13 dilué 10x (0,53 mg/ml) ; 20x (0,27 mg/ml) ; 40x (0,14 mg/ml) ou 80x (0,07 mg/ml) en PBS. Après un nouveau lavage des puits, nous y avons déposé une solution de phages dérivés d'un stock choisi pour sa forte réactivité avec la caséine (stock de phages III du panning B, Cfr. Figure 23). Ces phages ont été au préalable incubés 30 minutes dans des solutions d'EP M13 diluées 10x (0,53 mg/ml), 50x (0,11 mg/ml) ou 100x (0,05 mg/ml) en PBS. Après lavage des puits, les phages ont été élués en utilisant de la triéthylamine et ont ensuite été utilisés pour infecter des bactéries TG1 en phase de croissance exponentielle. Après 30 minutes d'infection, 25 μ l de suspension bactérienne ont été étalées sur milieu sélectif et mises à pousser pendant une nuit à 30°C.

Idéalement, si selon notre hypothèse les protéines pVIII du phage M13 participent à la fixation non spécifique des phages sur les antigènes et/ou les protéines de saturation présentes dans les puits, aucune colonie ne devrait être observée dans les cas de bactéries infectées avec les phages élués au départ de puits recouverts avec des extraits protéiques de phage M13, alors qu'au contraire des colonies devraient être présentes dans le cas de bactéries infectées avec des phages élués au départ de puits recouverts avec de l'hydrolysate de caséine. Aux contrôles positifs, que constituaient les phages anti-caséine sur les puits recouverts avec de

l'hydrolysate de caséine, nous avons ajouté des contrôles négatifs en remplaçant les phages par du PBS dans des puits. Les bactéries infectées avec les solutions éluées de ces puits ne devaient donner lieu à aucune colonie. C'est bien ce que nous avons constaté. Les résultats de ce test (une valeur pour chacune des conditions testées) sont présentés en figure 37.

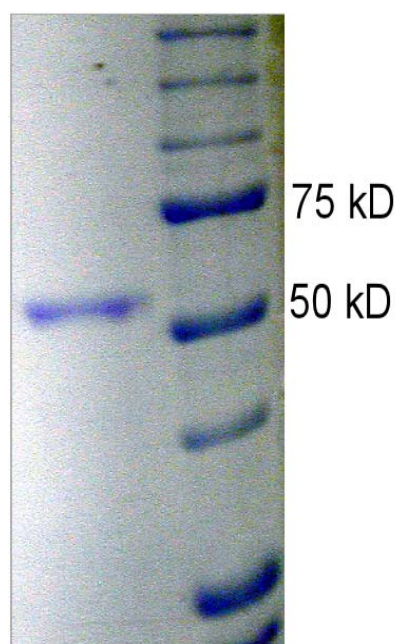


Figure 36 : Migration des protéines extraites du phage M13 dans un gel SDS-PAGE 8%.
Le marqueur de poids moléculaire est du Bio-rad precision protein standards 161-0372

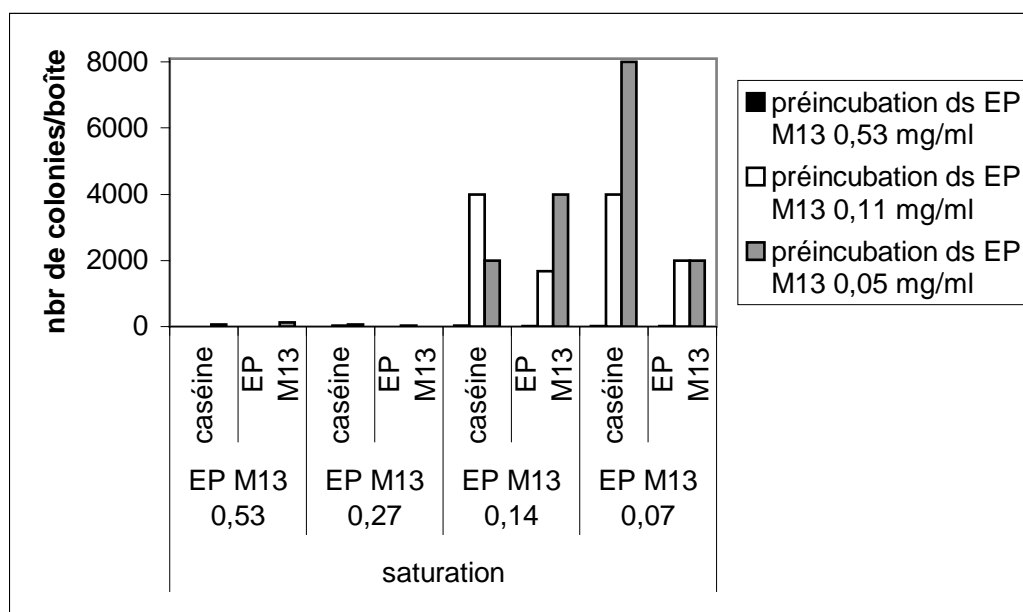


Figure 37 : Test de viabilité de phages mis en présence de différentes concentrations d'extrait protéique du phage M13 (EP M13) et influence de la concentration en EP M13 utilisée pour la saturation sur la sélection des phages. Les colonnes représentent le nombre de colonies bactériennes s'étant développées sur boîte de culture pour une condition donnée. Les antigènes utilisés sont l'hydrolysate de caséine 1% en PBS (caséine) et les protéines du phage M13 diluées à 0,53 mg/ml en PBS (EP M13). Quatre concentrations de EP M13 ont été utilisées lors de la saturation (0,53 ; 0,27 ; 0,14 et 0,07 mg/ml). Le stock de phages utilisé, connu pour sa forte réactivité avec l'hydrolysate de caséine, a été préincubé dans trois solutions d'EP M13 (0,53 ; 0,11 et 0,05 mg/ml). Les valeurs 2000 (++), 4000 (+++) et 8000 (+++++) ont été fixées arbitrairement et servent à comparer les densités en bactéries qu'il n'était pas possible de déterminer avec exactitude.

Concernant l'éventuel effet nocif de l'EP M13 (solution contenant du SDS, du DTT et du β -mercaptoéthanol) sur les phages, on constate que, lorsque cette solution est trop concentrée, elle a effectivement un effet néfaste sur la viabilité et/ou sur la capacité des phages à infecter les bactéries TG1 car pratiquement aucune bactérie mise en contact avec une solution de phages préincubés dans une solution d'EP M13 diluée 10x (0,53 mg/ml) ne se développe sur milieu sélectif (milieu sur lequel seules les bactéries infectées par un phage M13 recombinant peuvent se développer). L'EP M13 dilué 100x (0,05 mg/ml) ne montre pas ce problème de nocivité sur les phages.

De même, l'EP M13 utilisé aux concentrations respectives de 0,53 mg/ml et de 0,27 mg/ml lors de l'étape de saturation, ne donne lieu à pratiquement aucune colonie sur milieu sélectif, même pour des conditions optimales de pré-incubation des phages (EP M13 0,05 mg/ml). Dans ces conditions, la saturation est probablement trop importante, limitant la fixation des phages à l'hydrolysate de caséine. Ce problème disparaît lorsque l'EP M13 est employé respectivement à raison de 0,14 mg/ml et 0,07 mg/ml, cette dernière concentration donnant lieu à un nombre de colonies bactériennes nettement supérieur sur milieu sélectif [particulièrement bien visible dans les conditions optimales de pré-incubation des phages (EP M13 0,05 mg/ml)].

Nous avons conclu de ce test que nous devons idéalement, en vue d'un panning, utiliser de l'EP M13 préparé à 0,14 mg/ml ou à 0,07 mg/ml pour l'étape de saturation des puits et de l'EP M13 à 0,05 mg/ml pour l'étape de pré-incubation des phages. Par simplicité durant les manipulations, nous avons utilisé une même concentration en EP M13 pour ces deux étapes : soit 0,14 mg/ml dans un premier panning (Da) et 0,07 mg/ml dans un autre panning (Db), réalisé en parallèle.

III.e.3 La sélection d'affinité (EP M13 0,14 mg/ml et 0,07 mg/ml)

Au cours de cette quatrième procédure (Figure 38), deux pannings (Da et Db) ont été réalisés en parallèle au départ de la banque intermédiaire I du panning C dont 53% des inserts avaient une taille correcte. Dans le premier panning (Da), la saturation des protéines et l'étape de préincubation ont été effectuées avec une solution d'EP M13 préparée à 0,14 mg/ml alors que dans le second, le panning Db, la solution d'EP M13 utilisée dans ces deux étapes avait une concentration de 0,07 mg/ml. Les rinçages des puits au moyen de Tween 0,5% ont été maintenus dans les deux cas.

L'allure générale des résultats issus de ces deux pannings est très semblable. Dans les figures 38 A et 38 B, nous pouvons observer que le nombre de phages positifs (élus à partir des puits coatés avec le RGI) est plus élevé que le nombre de phages négatifs (élus à partir des puits coatés avec les protéines de saturation) dans les deux premiers cycles. Par contre, au troisième cycle, le nombre de phages positifs devient inférieur au nombre de phages négatifs. Le nombre de phages positifs est réduit à chaque cycle alors que les phages négatifs, dont le nombre avait fortement chuté en fin de deuxième cycle, ont tendance à augmenter au dernier cycle. Ajoutons que, au deuxième tour, le nombre de phages positifs élus est nettement supérieur dans les conditions du panning Da (EPM13 à 0,14 mg/ml) que dans celles du panning Db (EPM13 à 0,07 mg/ml) et ce avec un « bruit de fond » de phages négatifs faible. De la même façon, au second tour du panning Da (Figure 40A), le rapport phages positifs/phages introduits est 6 fois plus élevé que le rapport phages négatifs/phages introduits qui est, à ce stade, très faible. Ajoutons également qu'il y a une augmentation du rapport

phages positifs/phages négatifs entre le premier et le deuxième tour. Tout semble donc vouloir dire qu'un enrichissement spécifique s'est produit au cours du deuxième cycle du panning Da. Au troisième cycle, cet enrichissement spécifique est perdu : la population positive diminue d'un facteur 4 au troisième tour, alors que la non spécifique augmente de 7 fois. On ne peut par contre pas vraiment parler d'enrichissement spécifique dans le cas du panning Db (Figure 40B) : par rapport à la population totale, la population positive diminue du premier au deuxième tour pour augmenter légèrement lors du troisième cycle alors que la population négative, après avoir également diminué du premier au deuxième tour, augmente fortement lors du troisième, étant à ce stade plus importante que la population positive.

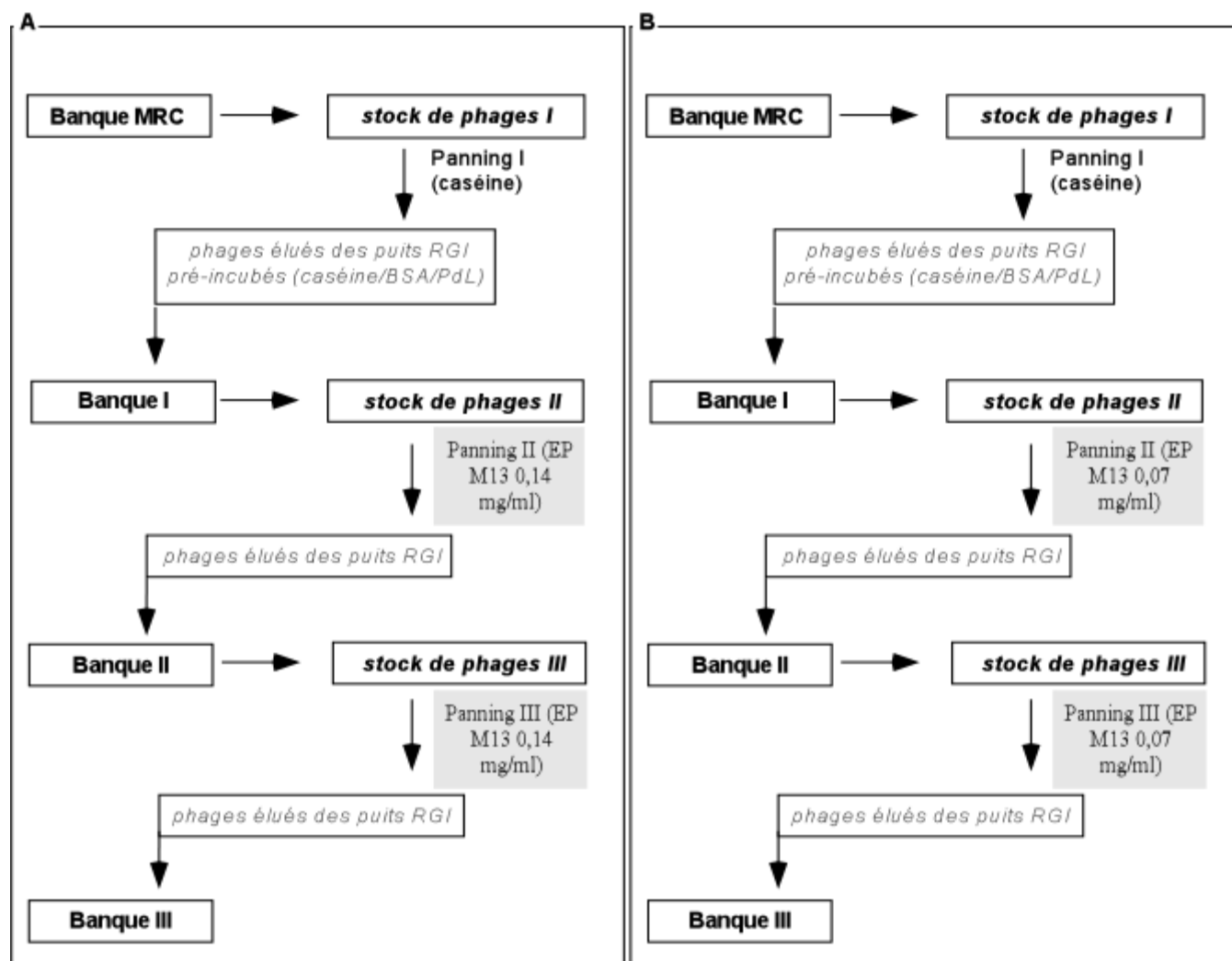


Figure 38 : Schéma des procédures de panning Da (A) et Db (B).

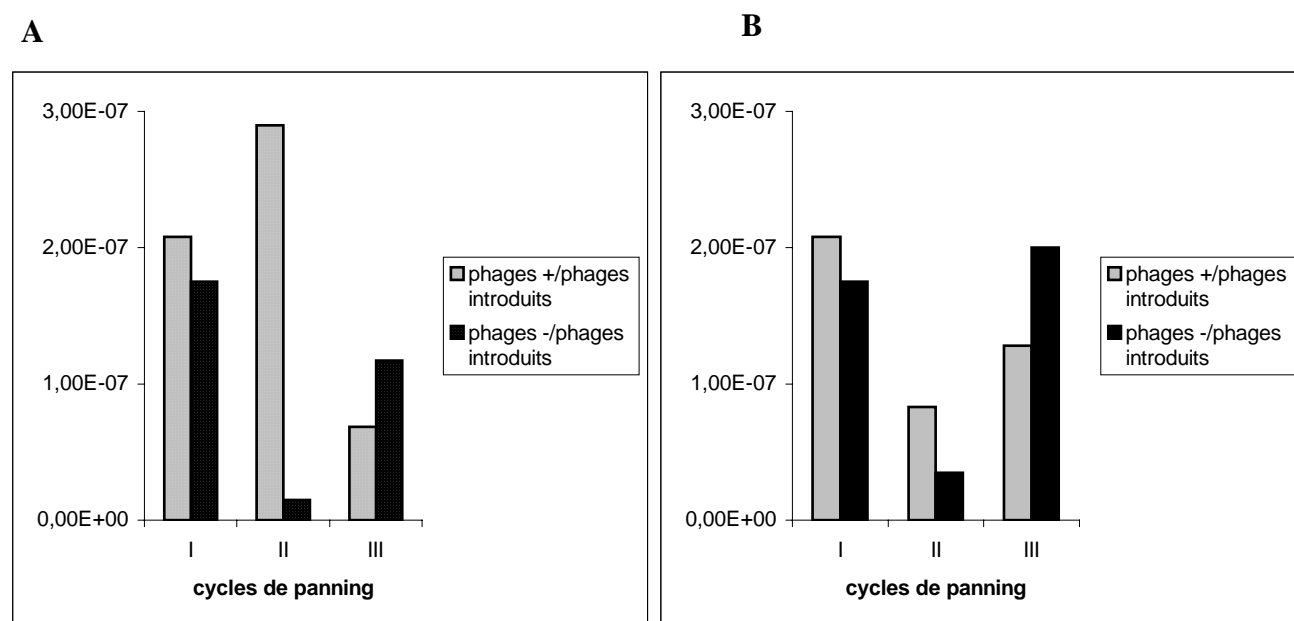


Figure 40 : **A.** Evolution de la proportion des phages positifs et négatifs par rapport à la quantité totale de phages introduits dans les 3 cycles de sélection du panning Da. **B.** Evolution de la proportion des phages positifs et négatifs par rapport à la quantité totale de phages introduits dans les 3 cycles de sélection du panning Db.

L'enrichissement spécifique ayant disparu au troisième cycle des deux procédures de panning testées, nous avons par la suite entrepris de contrôler leur fonctionnement par un test ELISA polyclonal et une analyse PCR des inserts contenus dans les clones constituant les banques intermédiaires. Les absorbances très faibles mesurées dans le test ELISA, probablement liées au vieillissement du lot d'anticorps secondaires utilisé, ne nous ont pas permis de tirer des conclusions (résultats non présentés). Nous ne présenterons donc dans la suite que les résultats obtenus en matière d'analyse des clones par PCR.

III.e.4 Analyse des clones des banques I, II et III des panning Da et Db par PCR sur colonies

Dix colonies ont été prélevées au hasard dans les banques I, II et III des pannings Da et Db et les inserts clonés dans le phagemide pHEN2 ont été amplifiés par PCR avec les amorces pHEN2 et LMB3 spécifiques du vecteur. L'extrapolation des résultats PCR obtenus dans le cas du panning Da (Figure 41 A) montre que si 53% des clones étaient pourvus d'un insert complet dans la banque I (issue du premier tour du panning C), ils ne sont plus que 20% dans la banque II et, dans la banque III, ces clones ont disparu. En revanche, le nombre de clones disposant d'un insert incomplet passe, lui, de 21% dans la banque I à 100% dans la banque III. Les clones dépourvus d'insert (c'est-à-dire n'ayant pas donné lieu à une amplification ou contenant du vecteur sans insert) représentent respectivement 26% et 20% des clones des banques I et II. En revanche, ils sont absents de la banque III.

Comme dans le cas du panning Da, le nombre de clones pourvus d'inserts complets diminue du premier au troisième tour du panning Db (Figure 41 B) : de 53% dans la banque I, il passe à 20% dans la banque II pour totalement disparaître dans la banque III. Les clones possédant un insert incomplet constituent 21% des clones de la banque I et 70% des clones des banques II et III. Enfin, si la banque I contient 26% de clones sans insert (c'est-à-dire

n'ayant pas donné lieu à une amplification ou contenant du vecteur sans insert), les banques II et III en contiennent respectivement 20 et 30%.

Les clones possédant des inserts complets ayant totalement disparu des banques III appartenant tant au panning Da qu'au panning Db, nous n'avions a priori aucune chance de pouvoir utiliser ces dernières pour l'isolement de phages monoclonaux spécifiques du RGI présentant des scFv complets. Nous n'avons donc pas jugé utile de poursuivre ces procédures de sélection.

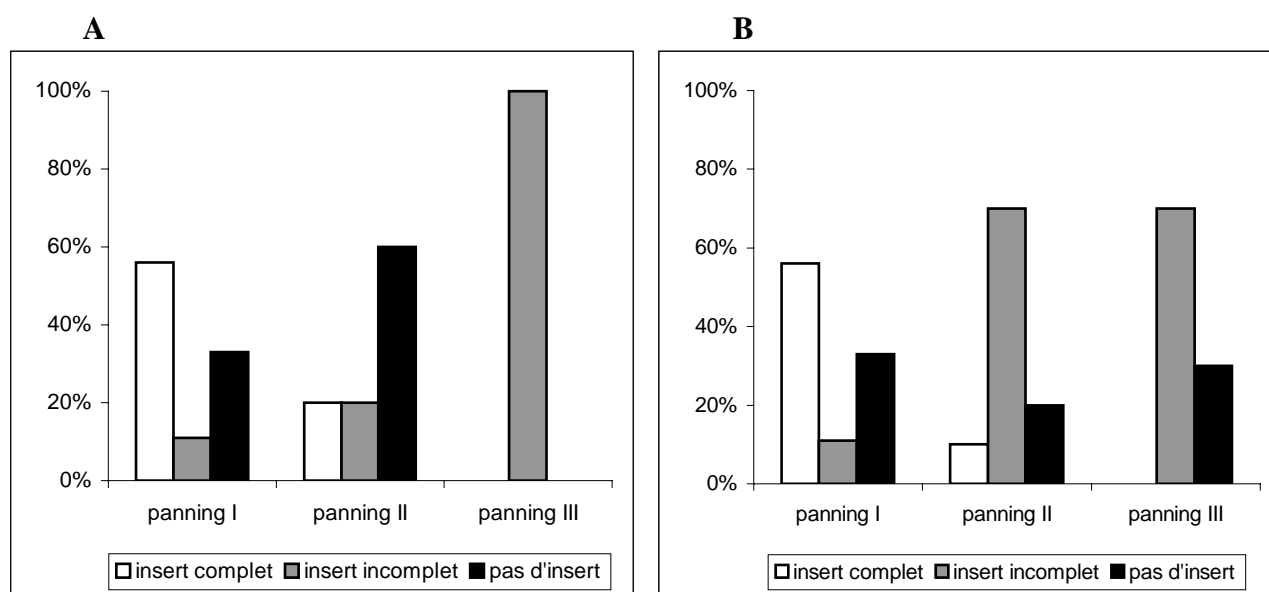


Figure 41 : **A.** Evolution de la taille des inserts présents dans des clones prélevés au hasard au sein des banques provenant des pannings I, II, III du panning Da. **B.** Evolution de la taille des inserts présents dans des clones prélevés, au hasard au sein des banques provenant des pannings I, II, III du panning Db. Les colonnes « pas d'insert » désignent les clones qui ne possèdent pas d'insert et/ou n'ont pas été amplifiés.

III.e.5. Conclusions

L'utilisation d'EP M13 en tant qu'agent de saturation n'a pas répondu pleinement à nos attentes. En effet, si nous avons pu conclure à la présence d'un bon enrichissement spécifique au cours du deuxième cycle du panning Da (EP M13 0,14 mg/ml), nous avons également constaté la présence d'une faible proportion de clones possédant des inserts correspondant à des scFv complets dans la banque II qui en résultait. Cet enrichissement a par ailleurs disparu lors du troisième tour du panning Da, caractérisé par une banque III dépourvue de clones possédant des inserts complets. En l'absence de résultats ELISA fiables, nous n'avons pas entrepris de poursuivre cette procédure de panning.

A ce stade de notre travail, nous avons été amenés à réexaminer nos résultats. Nous avons bien dû constater qu'aucune des procédures de panning utilisées jusque là ne nous avait permis d'obtenir un enrichissement en phages spécifiques (anti-RGI) tel que décrit dans la littérature pour d'autres antigènes et obtenu auparavant dans notre laboratoire dans le cas de phages anti-carraghénanes (Liners et van Cutsem, soumis) ou anti-alginates.

Nous nous sommes toutefois demandé si, malgré cette quasi-absence d'enrichissement, il n'était quand même pas possible d'isoler des phages monoclonaux spécifiques du RGI au départ des différentes banques générées lors des cycles de panning. Pour en être certain, il nous fallait mettre en évidence en ELISA polyclonal, et cette fois de manière non ambiguë, la réponse spécifique d'un stock de phages donné contre le RGI. Pour rappel, dans les ELISA polyclonaux réalisés, la reconnaissance de RGI par un stock de phages donné était systématiquement accompagnée d'une réponse similaire ou même parfois supérieure de ce stock de phages contre une ou plusieurs des protéines de saturation (hydrolysate de caséine, BSA, poudre de lait) employées dans le test. Nous avons envisagé de refaire des ELISA polyclonaux en utilisant un nouvel agent de saturation, avec lequel les phages n'étaient jamais entrés en contact lors des pannings, de manière à réduire au maximum toute possibilité de bruit de fond résultant d'un contact préalable des phages avec une protéine donnée.

Nous avons choisi de travailler avec du sérum de veau et avons entrepris de re-tester, en ELISA polyclonal, les différents stocks de phages générés au cours du panning A pour lequel nous avons observé, en conditions de saturation à la BSA, une reconnaissance significative du RGI par le stock de phages I qui était accompagnée à la fois (a) d'une réponse faible de ce même stock sur la caséine et la poudre de lait, ce qui semblait aller dans le sens d'une fixation spécifique des phages au RGI, mais également (b) d'une réponse élevée de ce même stock sur la BSA, ce qui tendait par contre à indiquer une absence de spécificité de la fixation des phages dans les puits coatés avec du RGI.

III.f. ELISA de phages polyclonaux avec une saturation au sérum de veau

Dans cet ELISA, les quatre populations de phages (I, II, III et IV) utilisées dans les quatre cycles du panning A ont été mises en présence soit de RGI, antigène cible de notre travail, soit des différents agents de saturation utilisés au cours du panning A (hydrolysate de caséine, BSA et PdL) et de cet ELISA (sérum de veau), l'agent de saturation étant du sérum de veau préparé à 10% en PBS. La fixation non spécifique des anticorps secondaires anti-M13 HRP a été vérifiée comme précédemment, en les mettant directement en contact avec le RGI ou avec les agents de saturations testés. Il n'a pas été possible d'intégrer un contrôle positif dans ce test, le polysérum anti-RGI étant épuisé.

Les valeurs présentées (Figure 42) sont des moyennes de duplicats desquels nous avons soustrait les moyennes correspondantes des contrôles anticorps secondaires. Nous pouvons constater, dans les conditions de saturation au sérum de veau, une augmentation de la réponse anti-RGI du stock de phages I au stock de phages IV. Toutefois, si les réponses des stocks de phages I et II sont toujours plus importantes sur le RGI que sur les autres protéines testées, il n'en est pas de même pour les stocks de phages III et IV qui reconnaissent également fortement la BSA, la poudre de lait et, dans une moindre mesure, le sérum de veau. L'hydrolysate de caséine est l'agent de saturation le moins reconnu par les stocks de phages testés.

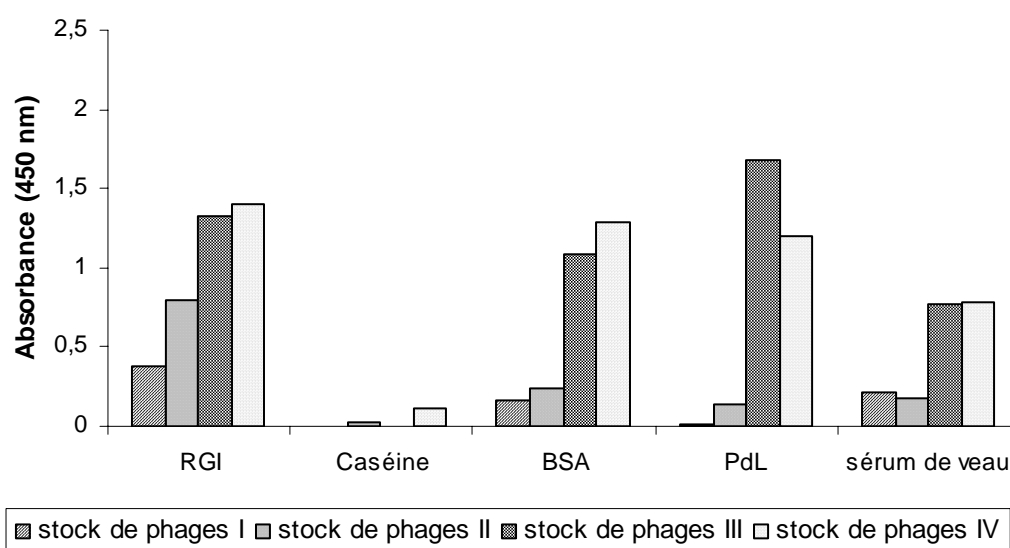


Figure 42 : ELISA des phages polyclonaux issus des 4 cycles du panning A avec une saturation au sérum de veau 10% en PBS. Capacité des stocks de phages utilisés avant les tours I, II, III, IV du panning A à reconnaître le RGI et comparaison avec la reconnaissance de protéines contrôles (caséine, BSA, PdL, sérum de veau) par les mêmes stocks de phages.

Ces résultats nous permettent donc de conclure, et cette fois sans ambiguïté, qu'il y a bien une réponse spécifique des stocks de phages I et II contre le RGI. Nous pouvons dès lors nous attendre à pouvoir isoler des phages monoclonaux spécifiques du RGI à partir de ces stocks de phages. Cela ne veut pas dire pour autant qu'il serait impossible de le faire au départ

des stocks III et IV mais ce serait dans ce cas nettement plus difficile vu la présence, dans ces mêmes stocks, de populations de phages capables de reconnaître la BSA, la PdL et le sérum de veau. Cependant, ayant montré auparavant que des clones possédant des inserts correspondant à des scFv complets n'étaient présents que dans la banque I, dérivée du cycle de panning A réalisé avec le stock de phages I, nous avons entrepris de réaliser un ELISA de phages monoclonaux au départ de cette banque. Le sérum de veau étant un bon agent de saturation, nous avons continué à l'utiliser. L'antigène contrôle choisi était l'hydrolysate de caséine, peu ou pas reconnu par les stocks de phages dans les conditions de saturation au sérum de veau.

III.g. Isolement de phages monoclonaux anti-RGI

Afin d'isoler des clones de phages porteurs de scFv anti-RGI en surface, des préparations monoclonales de phages recombinants ont été produites au départ de la banque I du panning A de la manière suivante : soixante clones ont été prélevés au départ de boîtes de culture sur lesquelles des aliquotes de la banque I avaient été étalées. Ces clones ont été mis en culture liquide individuellement, dans des puits d'une boîte de microtitration, et les cultures à saturation ont été infectées par des phages helper. Les préparations de phages recombinants obtenues ont été utilisées dans un test ELISA qui a permis de comparer la fixation des phages recombinants sur le RGI et sur l'hydrolysate de caséine, dans des conditions de saturation en sérum de veau.

Les absorbances moyennes des contrôles négatifs (24 valeurs) étaient de 0,067 et de 0,065 pour les puits recouverts avec du RGI et de l'hydrolysate de caséine respectivement. Les valeurs présentées à la figure 43 sont celles desquelles les valeurs contrôles ont été soustraites. Six des 60 clones analysés ont donné lieu à une réponse jugée significative sur le RGI : les clones D11 et F2 qui présentent une réponse respectivement 8 fois et 17 fois supérieure au contrôle caséine, et les clones B2, B7, F7 et G11 qui présentent des réponses anti-RGI plus faibles.

Les phages recombinants ayant répondu positivement contre le RGI ont été ré-amplifiés de manière à pouvoir les re-tester en ELISA et confirmer ou non leur reconnaissance du RGI. Contrairement à l'ELISA précédent, les clones B7 et G 11 n'ont plus donné lieu à une réponse significative sur le RGI (résultats non présentés). Des amplifications PCR utilisant les amorces spécifiques du vecteur pHEN2 ont été réalisées sur les clones dont nous avons confirmé la réponse positive anti-RGI en ELISA. Nous avons constaté (Figure 44) que le clone F2, qui présente la réponse anti-RGI la plus élevée en ELISA, contient un insert correspondant à un scFv complet. Les clones D11 et F7, qui répondent de manière plus faible contre le RGI en ELISA présentent quant à eux des inserts incomplets. La présence de deux inserts (complet et incomplet) correspondant au clone B2 indique que, dans ce cas, nous n'avons pas obtenu une préparation monoclonale de phages recombinants.

Nous avons donc, au terme de ce travail, réussi à isoler un clone de phage recombinant hautement intéressant, le clone F2, exprimant en membrane un scFv spécifique du polysaccharide cible de ce travail, le RGI.

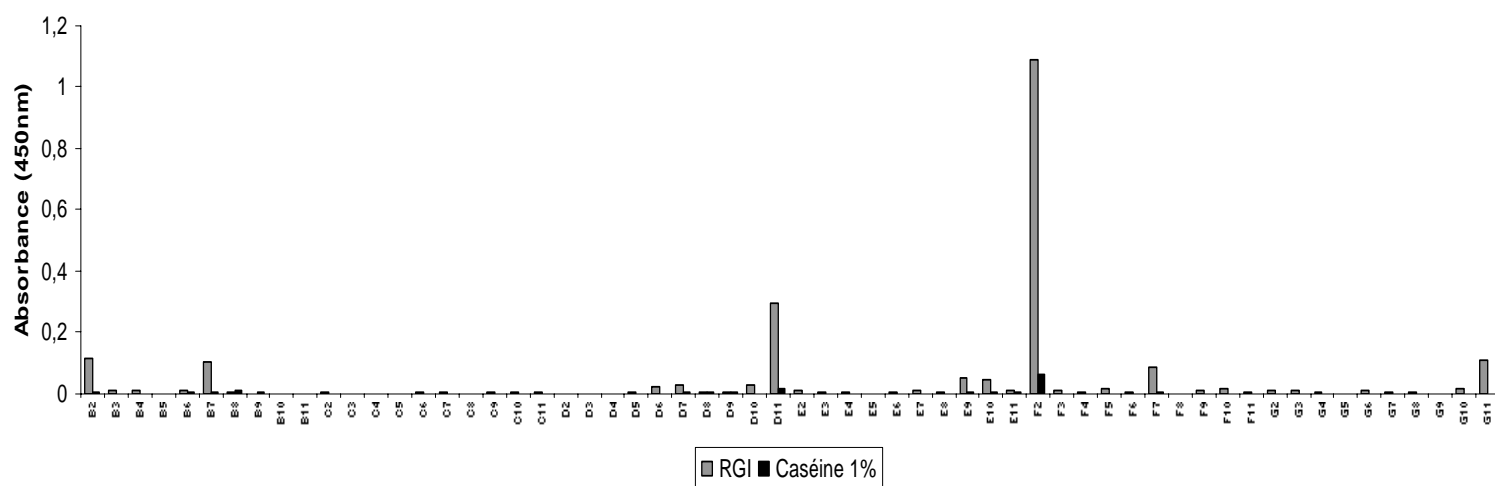


Figure 43 : ELISA monoclonal. Reconnaissance du RGI et de l'hydrolysate de caséine par 60 clones issus de la banque I du panning A.

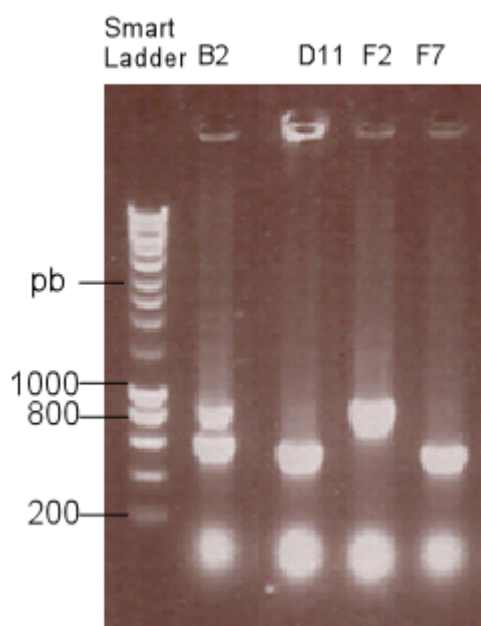


Figure 44 : Révélation sur gel d'agarose de l'analyse PCR des clones positifs B2, D11, F2 et F7.

Discussion générale et perspectives

Le rhamnogalacturonane I (RGI) est une molécule pectique complexe de la paroi cellulaire végétale dont le squelette est composé d'une alternance d'acides galacturoniques et de rhamnoses, eux-mêmes porteurs de chaînes latérales riches en arabinose et/ou galactose. Les dernières études fondamentales menées sur la paroi cellulaire ont révélé que le RGI était un important polysaccharide des parois. Un nouveau modèle d'interaction des composants pariétaux place ce polymère au centre du squelette pectique (Vincken *et al.*, 2003a). Il a été démontré que les chaînes latérales qui le composaient jouaient un rôle important dans le contrôle de phénomènes tels que le maintien de la flexibilité des stomates (Jones *et al.*, 2003) et surtout la différenciation et la croissance cellulaire (Bush *et al.*, 2001). Etant donné la variété des chaînes latérales et sachant que nous ne disposons actuellement que de peu de moyens permettant d'étudier ce composé pectique, il est difficile de déterminer clairement l'ensemble des rôles qu'il joue dans la paroi. Dans ce contexte, les anticorps contre les composés polysaccharidiques constituent des outils efficaces. Actuellement, il n'existe que quatre anticorps contre le RGI à savoir le LM5 qui reconnaît les chaînes latérales de (1→4)-β-D-galactane (Jones *et al.*, 1997) ; le LM6, un anti-(1→5)-α-L-arabinane (Willats *et al.*, 1998) ; le CCRC-M7, dont l'épitope est composé de (1→6)-β-galactane auquel sont fixés des arabinoses (Pulhmann *et al.*, 1994) et le CCRC-M2 dont l'épitope n'a pas encore été défini (Pulhmann *et al.*, 1994). Il n'existe donc à l'heure actuelle aucune sonde spécifique du motif de base du RGI.

Parmi les techniques de production de sondes spécifiques contre les polysaccharides, l'obtention d'anticorps recombinants par phage display s'avère être prometteuse : elle contourne les limites inhérentes à la production d'anticorps par la technique des hybridomes. Le travail que nous avons réalisé dans le cadre de ce mémoire avait pour but d'isoler, par phage display, un anticorps recombinant anti-RGI au départ d'une banque naïve, la banque Griffin 1, mise à notre disposition par le MRC. Cette banque est composée de phages exprimant à leur surface des scFv, les plus petits fragments d'anticorps capables de reconnaître leur antigène. Nous avons pour cela réalisé quatre procédures de sélection (ou panning) dont le but était de générer de nouvelles banques enrichies en phages-anticorps reconnaissant spécifiquement le RGI, ceci afin d'augmenter la probabilité d'isoler un clone anti-RGI dans des tests ELISA monoclonaux. Pour chaque panning, nous avons suivi une même approche composée de trois étapes. Ainsi, nous avons d'abord réalisé le panning proprement dit. Nous avons ensuite vérifié son fonctionnement en analysant la qualité des banques de phages intermédiaires générées lors du panning dans des tests ELISA polyclonaux. Nous avons enfin analysé par PCR la taille des inserts contenus dans les clones bactériens issus de ces banques.

Rappelons ici que la spécificité de l'enrichissement en phages exprimant des scFv anti-RGI est évaluée à chaque cycle, par titration du nombre de phages élués de puits recouverts de RGI d'une part, et d'une protéine contrôle d'autre part. Cette même protéine contrôle sert également d'agent de saturation, dans le but de réduire les fixations non spécifiques des phages sur le support solide.

Dans les deux premiers pannings, nous avons opté pour un changement de protéine de saturation à chaque cycle de manière à éviter l'enrichissement des populations de phages élués des puits recouverts de RGI et saturés avec une protéine donnée, en phages reconnaissant plus particulièrement cette protéine. Les solutions que nous avons choisies étaient l'hydrolysate de caséine 1% en PBS, la poudre de lait 1% en PBS et la BSA 3% en PBS, chacune ayant déjà permis d'obtenir des résultats positifs dans d'autres études (Liners et Van Cutsem, soumis ; Chowdhury *et al.*, 1997 ; Okamoto *et al.*, 1997). Nos résultats ne nous

ont pas permis de conclure à un enrichissement spécifique et significatif des banques générées au cours de ces deux pannings en phages-anticorps reconnaissant le RGI. Nous avons également constaté que l'usage de BSA était à proscrire dans le cadre d'une sélection d'affinité de phages recombinants dirigés contre des polysaccharides tels que le RGI. Son efficacité est, en effet, trop faible pour permettre de sélectionner efficacement des phages spécifiques.

Le troisième panning a été réalisé, non plus en changeant de solution de saturation entre chaque cycle, mais en ajoutant au protocole de base deux étapes supplémentaires dont le but était de soustraire les phages élués susceptibles d'encore réagir avec les solutions de saturation. Ainsi, les phages élués à partir des puits recouverts de RGI ont été ré-incubés dans un mélange protéique avant d'être centrifugés et utilisés pour ré-infecter des bactéries en vue de générer des banques secondaires. A nouveau, nous n'avons obtenu au cours des cycles de panning aucun enrichissement spécifique et significatif des populations de phages en phages-anticorps spécifiques du RGI.

Enfin, le dernier panning a été réalisé en saturant les puits avec un extrait protéique préparé au départ du phage M13 lui-même. Nous pensions que cette solution pourrait être plus efficace que les solutions testées antérieurement car, selon notre hypothèse, il était fort probable que les protéines PVIII, présentes approximativement en 2700 exemplaires à la surface du phage, intervenaient dans les fixations non spécifiques des phages avec la surface des puits ou avec les agents saturants. Dans ce cas, une saturation des puits avec ces mêmes protéines devait limiter le nombre d'interactions non spécifiques des particules de phages avec le support solide ou les molécules immobilisées. Dans cette procédure de panning, nous avons obtenu un enrichissement spécifique au second tour, qui ne s'est malheureusement pas confirmé dans les étapes ultérieures.

Dans toutes nos tentatives, aucun enrichissement spécifique en phages reconnaissant le RGI n'a donc eu lieu. Chaque augmentation de populations de phages anti-RGI était accompagnée d'une augmentation de phages non spécifiques, reconnaissant les protéines de saturation testées. De la même manière, l'analyse des inserts présents dans les clones des banques intermédiaires générées à chaque tour de panning indique que les clones possédant des inserts de taille correcte, correspondant à des scFv complets, diminue à chaque tour de panning, les clones possédant des inserts incomplets au cycle de réplication plus court (de Bruin *et al.*, 1999 ; Azzazy *et al.*, 2002), prenant progressivement le dessus. Les résultats obtenus tout au long de ce travail démontrent bien le problème que pose la présence de phages pourvus de scFv incomplets dans la banque.

Les ELISA polyclonaux effectués après chacun de ces pannings vont dans le même sens : aucune reconnaissance spécifique significative du RGI par les stocks de phages produits à chaque tour n'a vraiment eu lieu, chacun d'entre eux répondant en parallèle de façon semblable ou supérieure, sur au moins un des agents de saturation (l'hydrolysate de caséine, la poudre de lait ou la BSA).

La réalisation d'un nouvel ELISA polyclonal avec un nouvel agent de saturation auquel les phages n'avaient encore jamais été exposés au cours des pannings, le sérum de veau, a toutefois permis d'obtenir une réponse significative, et cette fois spécifique, de deux stocks de phages contre le RGI. 60 clones prélevés au hasard au départ d'une banque intermédiaire correspondant à un de ces stocks ont été mis en culture. Les clones de phages-anticorps générés suite à l'infection des 60 clones bactériens par des phages M13 ont été

testés en ELISA monoclonal en utilisant le sérum de veau comme agent saturant. Des six clones positifs répondant sur le RGI et pas sur la caséine, un seul, le clone F2, dont la réponse en ELISA était la plus élevée, possédait un insert complet.

Il est souvent mentionné dans la littérature qu'il n'existe pas de protocole standard efficace de panning pour tous les antigènes et que ce protocole doit fréquemment être réadapté en fonction de l'antigène cible (Willats, 2002 ; Benhar, 2001). Nous nous apercevons en effet que les profils d'enrichissement de la procédure de panning ayant conduit à l'isolement des anticorps recombinants contre des polysaccharides chargés, des anti-carraghénanes et des anti-alginates, obtenus au laboratoire (Liners et Van Cutsem, soumis) en suivant le protocole proposé par Griffin, sont différents des procédures de panning testées dans ce mémoire en vue de l'isolement d'un Ac contre le RGI, un polysaccharide neutre. Ce dernier s'est montré beaucoup plus ardu. La procédure d'obtention d'anticorps anti-carraghénanes et anti-alginates montrait des profils d'enrichissement classiques, avec, en parallèle, une réponse spécifique en ELISA et des banques contenant exclusivement des inserts complets, ce qui, ici, n'a pas été le cas.

Les facteurs d'enrichissement dépendent de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène cible, de l'efficacité d'exposition des anticorps à la surface des phages, de la concentration de l'antigène et de la méthode de sélection. Ils sont aussi influencés par la présence de phages se liant de manière non spécifique, ce qui nécessite d'établir plusieurs cycles de panning. En pratique, un enrichissement minimal est nécessaire, dans le but de ne pas perdre l'anticorps, en particulier lorsque la taille de la banque est élevée (de Haard *et al.*, 1998). Nous avons toutefois mis en évidence dans ce travail qu'il était possible d'isoler un phage-anticorps à partir d'une banque non enrichie. Enfin, il semblerait que dans le cas d'un polysaccharide neutre, l'isolement d'un phage-anticorps spécifique dépende de l'usage de différents agents saturants d'une part pour les pannings et d'autre part pour les tests ELISA.

Les étapes ultérieures à celles menées dans ce travail consisteront, dans un premier temps, à déterminer l'épitope reconnu par cet anticorps « F2 » en évaluant sa capacité à reconnaître des RGI enrichis ou appauvris en arabinanes et/ou galactanes et en évaluant sa réactivité vis-à-vis de fragments polysaccharidiques de RGI analysés préalablement par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par spectrométrie de masse. Il faudra aussi vérifier qu'il n'est pas sujet à des réactions croisées avec d'autres composants de la paroi. L'insert contenu dans ce clone devra également être séquencé. L'anticorps F2 devra être produit sous forme soluble en infectant une souche bactérienne dite « non-suppressive » (HB2151) avec le phage-anticorps « F2 ». Enfin, la capacité de cet anticorps recombinant à fonctionner en tant que sonde immunologique devra être testée par des marquages de tissus de dicotylédones dont nous savons que la présence de RGI y est élevée (exemple : les tubercules de pomme de terre) (Bush et McCann, 1999).

Références bibliographiques

- Andème-Onzighi, C., Lhuissier, F., Vicré, M., Yamada, H., Driouich, A.** (2000) A (1→3,6)-β-D-galactosyl epitope containing uronic acids associated with bioactive pectins occurs in discrete cell wall domains in hypocotyls and root tissues of flax seedlings. *Histochem. Cell Biol.*, **113**: 61-70.
- Azzazy, H.M.E., Highsmith, W.E., Jr.** (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, **35**: 425–445.
- Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J.** (2001) Phage display. A laboratory manual. pg 10.5 à 10.15 et pg 17.1 à 17.7. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Benhar, I.** (2001) Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, **19**: 1-33.
- Bush, M.S. and McCann, M.C.** (1999) Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiologia plantarum*, **107**: 201–213.
- Bush, M.S., Marry, M., Huxham, I.M., Jarvis, M.C., McCann, M.C.** (2001) Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta*, **213**: 869-80.
- Carpita, N. & Gibeaut, D.** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, **3**: 1-30.
- Chowdhury, P.S., Chang, K., Pastan, I.** (1997) Isolation of anti-mesothelin antibodies from a phage display. *Molecular Immunology*, **34** : 9-20.
- Cosgrove, D.J.** (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**: 171–201.
- Cote, F. & Hahn, M.G.** (1994) Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol.*, **26**: 1379-411.
- De Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R., Quattrocchio, F.** (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology*, **17**: 397-399.
- de Haard, H., Henderikx, P., Hoogenboom, H.** (1998) Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **31**: 5-31.
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., Bruyns, A-M., De Neve, M., De Wilde, C., Gerats, T., Van Montagu, M., Fischer, R., Depicker, A.** (1997) Use of phage display for isolation and characterization of single-chain variable fragments against dihydroflavonol 4-reductase from *Petunia hybrida*. *FEBS Letters*, **403**: 116-122.
- Dübel, F. & Breitling, S.** (1999) Recombinant antibodies. pg. 1-14 et 34-42. John Wiley & Sons, Inc; New York.

- Griffiths, A., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zaccolo, M., Gherardi, E., Winter, G.** (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal*, vol. 13 n°14 pp. 3245-3260.
- Hinfray, J.** (1998) Le phage display. *Biofutur*, cahier n°107 dans la revue n°182.
- Hoogenboom, H.R. & Chames, P.** (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today*, Vol. 21 n°8: 371-378.
- Hoogenboom, H.R.** (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Tibtech*, **15**: 62-70.
- Jones, L., Milne, J., Ashford, D., McQueen-Mason, S.J.** (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *PNAS*, Vol. 100 n°20 pp. 11783-11788.
- Jones, L., Seymour, G.B., Knox, J.P.** (1997) Localisation of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-β-D-galactan. *Plant Physiol.*, **113**: 1405-1412.
- Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D., Albersheim, P.** (1973) The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components *Plant Physiol.*, **51** : 188-196.
- Kidd, P.** (1996) A new approach to metastatic cancer prevention : modified citrus pectin (MCP), a unique pectin that blocks cell surface lectins. *Alt. Med. Rev.*, **1** : 4-10.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., Roberts, K.** (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*, **181**: 512-521.
- Liners, F. & Van Cutsem, P.** (2004) Production of a phage-display recombinant antibody against carrageenans and characterization of a mechanism of chain association. *Plant physiology* soumis.
- Liners, F., Letesson, J.-J., Didembourg, C., Van Cutsem, P.** (1989) Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.*, **91**: 1419-1424.
- Liners, F., Thibault, J-F., Van Cutsem, P.** (1992) Influence of the degree of polymerisation of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol.*, **99**: 1099-1104.
- MacKenzie, R. & To, R.** (1998) The role of valency in the selection of anti-carbohydrate single-chain Fvs from phage display libraries. *Journal of Immunological Methods*, **220**: 39-49.
- Mathot, T., Takasaki, M., Takabe, K., Kobayashi, M.** (1998) Immunocytochemistry of rhamnogalacturonane II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.*, **39**: 483-491.

- McCartney, L., Steele-King, C.G., Jordan, E., Knox, J.P.** (2003) Cell wall pectic (1→4)-β-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *The Plant Journal*, **33**: 447-454.
- Meikle, P.J., Hoogenraad, N.J., Bonig, I., Clarke, A.E., Stone, B.A.** (1994) A (1→3,1→4)-β-glucan specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1→3,1→4)-β-glucans. *The Plant Journal*, **5**: 1-9.
- Meikle, P.J., Ng, K.F., Johnson, E., Hoogenraad, N.J., Stone, B.A.** (1991) The beta-glucan synthase from *Lolium multiflorum*. Detergent solubilization, purification using monoclonal antibodies, and photoaffinity labeling with a novel photoreactive pyrimidine analogue of uridine 5'-diphosphoglucose. *J Biol Chem.*, **266**:22569-8.
- Michaelesen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgasen, K., Paulsen, B.S.** (2000) Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scand. J. Immunol.*, **52** : 483-490.
- Mohnen, D.** (1999) Biosynthesis of pectins and galactomannans. Dans: Pinto, B.M. (Ed.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3, Carbohydrates and their Derivatives Including Tannins, Cellulose, and Related Lignins. Elsevier, Oxford, pp. 497–527.
- Nagy, A.** (2000) Cre recombinase : the universal reagent for genome *Genesis*, **26** : 99-109.
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., Winter, G.** (1994) Antibody fragments from a “single pot” phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal*, vol. 13 n°3 pp. 692-698.
- O'Neill, M.A. and York, W.S.** (2003) The composition and structure of plant primary cell walls. Dans: Rose, J.K.C. (Ed), *Annual Plant reviews*, vol. 8, The plant cell, wall. Blackwell publishing Ltd, Oxford, pp. 2-54.
- Okamoto, N., Kennedy, S.D., Barron-Casella, E.A., Casella, J.F., Inoko, H., Kickler, T.S.** (1998) Identification of human heavy chain antibody fragment directed against human platelet alloantigen 1a by phage display library. *Tissue Antigens*, **51** : 156-163.
- Oomen, R., Doeswijk-Voragen, C., Bush, M., Vincken, J-P., Borkhardt, B., Van den Broek, L., Corsar, J., Ulvskov, P., Voragen, A., McCann, M.C., Visser, R.** (2002) In muro fragmentation of the rhamnogalacturonane I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development. *The Plant Journal*, **30**: 403-413.
- Pettolino, F.A., Hoogenraad, N.J., Ferguson, C., Bacic, A., Johnson, E., Stone, B.A.** (2001) A (1→4)-beta-mannan-specific monoclonal antibody and its use in the immunocytochemical location of galactomannans. *Planta*, **214**: 235-42.
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, Dunning, M.J. N., Albersheim, P., Darvill, A.G. and Hahn, M.G.** (1994) Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. Characterization of monoclonal antibody terminal α-(1→2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol.*, **104**: 699-710.

- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E.** (2000) Biologie végétale. pg 61-68. De Boeck Université s.a., Bruxelles.
- Reiter, W-D.** (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 536–542.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D.** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry*, **57**: 929–967.
- Rodi, D.J. & Makowski, L.** (1999) Finding a needle in a vast molecular haystack. *Current opinion in biotechnology*. **10**: 87-93.
- Russel, M., Lowman, H.B., Clackson, T.** (2004) Introduction to phage biology and phage display. 1-26. Phage Display - A Practical Approach. Eds Clackson T. and Lowman H.B. Oxford University press, Oxford.
- Schols, H.A. & Voragen, A.** (2002) The chemical structure of pectins. Dans: Seymour, G.B. et Knox, J.P. (Eds), Pectins and their manipulation. Blackwell publishing Ltd, Oxford, pp. 1-29.
- Shinohara, N. & Fukuda, H.** (2002) Isolation of monoclonal antibodies recognizing rare and dominant epitopes in plant vascular cell walls by phage display subtraction. *Journal of Immunological Methods*, **264**: 187–194.
- Sidhu, S.S.** (2000) Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**:610–616.
- Sidhu, S.S.** (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*. **18**: 57–63.
- Skjøl, M., Pauly, M., Bush, M., Borkhardt, B., McCann, M.C., Ulvskov, P.** (2002) Direct interference with rhamnogalacturonan I biosynthesis in golgi vesicles. *Plant Physiology*, Vol. 129 pp. 95-102.
- Smith, G.P. & Petrenko, V.A.** (1997) Phage Display. *Chem. Rev.* **97** : 391-410.
- Sørensen, S. O., Pauly, M., Bush, M., Skjøl, M., McCann, M.C., Borkhardt, B., Ulvskov, P.** (2000) Pectin engineering: Modification of potato pectin by in vivo expression of an endo-1,4-β-D-galactanase. *PNAS*, vol. 97 n°13: 7639–7644.
- Steffan, W., Kovàc, P., Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G.** (1995) Characterization of a monoclonal antibody that recognizes an arabinosylated (1→6)-β-D-galactan epitope in plant complex carbohydrates. *Carbohydr Res.*, **275**:295-307.
- Tijssen, P.** (1988) Laboratory techniques I biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. pg. 1-14 et 34-42. Burdon and Knippenberg. ElsevierNew York.

- VandenBosch, K.A., Bradley, D.J., Knox, J.P., Perotto, S., Butcher, G.W., Brewin, N.J.** (1989) Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal*, **8**: 335-342.
- Vincken, J-P., Schols, H.A., Oomen, R., Beldman, G., Visser, R., Voragen, A.** (2003a) Pectin-The hairy thing. 47-59.
- Vincken, J-P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F.** (2003b) If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, **132**: 1781–1789.
- Völkel, T., Korn, T., Bach, M., Müller, R., Kontermann, R.E.** (2001) Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies. *Protein Engineering*, vol. 14 n°10 : 815-823.
- Willats, W.G., Gilmartin, P.M., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P.** (1999a) Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naïve phage display library. *The Plant Journal*, **18**: 57-65.
- Willats, W.G., Knox, J.P.** (2003) Molecules in context: probes for cell wall analysis. Dans: Rose, J.K.C. (Ed), *Annual Plant reviews*, vol. 8, The plant cell, wall. Blackwell publishing Ltd, Oxford, pp. 92-110.
- Willats, W.G., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Benen, J., Christensen, T.M.I.E.; Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P.,** (2000a) Analysis of pectic epitopes recognised by conventional and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides and enzymatic degradation. *Carbohydr Res.*, **327** :309-320.
- Willats, W.G., Marcus, S.E., Knox, J.P.** (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1→5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr Res.*, **308**:149-52.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P.** (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, **47**: 9–27.
- Willats, W.G., McCartney, L., Steele-King, C.G., Marcus, S.E., Mort, A., Huisman, M., van Alebeek, G-J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Le Goff, A., Bonnin, E., Thibault, J-F. & Knox, J.P.** (2004) A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta*, **218**: 673-681.
- Willats, W.G., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., Van Alebeek, G-J., Voragen, A., Marcus, S.E., Christensen, T., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S., Knox, J.P.** (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276 n°22 pp. 19404-19413.

- Willats, W.G., Steele-King, C.G., Marcus, S.E., Knox, J.P.** (1999b) Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant Journal*, **20**: 619-628.
- Willats, W.G., Steele-King, C.G., McCartney, L., Orfila, C., Marcus, S.E., Knox, J.P.** (2000b) Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.*, **38**: 27-36.
- Willats, W.G.T.** (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, **50**: 837-854.
- Williams, M.N.V., Freshour, G., Darvill, A.G., Albersheim, P., Hahn, M.G.** (1996) An antibody Fab selected from a recombinant phage display library detects deesterified pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II in plant cells. *Plant Cell*, **8**: 673-685.
- Yamada, H.** (2001) Les pectines d'intérêt thérapeutique. *Biofutur*, **208** : 37-41.
- Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y.** (1989) Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr Res.*, **189** : 209-226.